



Etude des interactions protéine-protéine à l'enveloppe nucléaire

Isaline Herrada

► To cite this version:

Isaline Herrada. Etude des interactions protéine-protéine à l'enveloppe nucléaire. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACLS278 . tel-01304801

HAL Id: tel-01304801

<https://theses.hal.science/tel-01304801>

Submitted on 20 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 425
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie

THÈSE DE DOCTORAT

Biochimie et Biologie Structurale

Par

Isaline HERRADA

Étude des interactions protéine-protéine
à l'enveloppe nucléaire

Date de soutenance : 07/10/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse : Dr. Sophie ZINN-JUSTIN

Rapporteurs : Dr. Isabelle LANDRIEU

Dr. Iñaki GUIJARRO

Examineurs : Dr. Gisèle BONNE

Prof. Herman VAN-TILBURGH (président du jury)

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en grande partie au Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie (LBSR) du CEA Saclay. C'est tout naturellement que je remercie en premier le Dr. Sophie Zinn-Justin, ma directrice de thèse et responsable du laboratoire pour son accueil et pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse sur un sujet passionnant. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et votre soutien et surtout un grand merci pour votre enthousiasme et votre optimisme sans limites qui m'ont énormément aidé dans les moments de doute.

Merci aux Drs. Isabelle Landrieu et Iñaki Guijarro qui ont pris le temps de lire cette thèse et ont accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également au Dr. Gisèle Bonne et au Prof. Herman Van-Tilbeurgh qui ont fort aimablement accepté de juger ce travail et d'en être les examinateurs.

Merci encore au Dr. Gisèle Bonne de m'avoir invité à participer à tous ces congrès merveilleux sur les laminopathies, même si j'étais la seule personne à présenter des résultats de biologie structurale et biophysique. C'était à chaque fois une aventure incroyable et scientifiquement enrichissante.

J'ai lors de mes 4 années de thèse, eu l'occasion de passer 8 mois au FMP (Leibniz-institut Für Molekulare Pharmakologie) à Berlin dans l'équipe du Dr. Philipp Selenko. Je remercie Philipp pour son accueil et ses conseils ainsi que les membres de son équipe et plus particulièrement le Dr. François-Xavier Theillet pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Je remercie également le Prof. Howard J. Worman de l'université de Columbia à New-York qui a participé activement au suivi de la rédaction de mes publications de thèse et qui a toujours su donner un avis clair et pertinent quant à l'analyse de mes résultats.

Pour ses conseils scientifiques précieux sur l'actine, je tiens à remercier le Dr. Louis Renault du Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS) au CNRS de Gif-sur-Yvette.

Je remercie très sincèrement toutes les personnes ayant participé à l'obtention des résultats présentés dans cette thèse. Merci à Florian et surtout à Camille pour m'avoir aidé au quotidien. Un énorme merci au Dr. Brigitte Buendia (Laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative de l'université Paris-Diderot) pour avoir réalisé la totalité des expériences en cellule, par PLA ou immunofluorescence. Je remercie également le Dr. Christophe Velours de la plateforme de biophysique du LEBS, pour avoir réalisé les expériences d'UCA et de SEC-MALS même à 7h00 du matin. Je n'aurai pas pu obtenir les magnifiques images de microscopie électronique à transmission présentées dans cette thèse sans les Drs. Daniel Lévy (équipe Microscopie Moléculaire des Membranes à l'Institut Curie de Paris) et Dmytro Puchkov (Core Facility Cellular Imaging du FMP, Berlin). Merci à vous. Je remercie également le Dr. Magali Aumont-Nicaise de la plateforme de calorimétrie d'Orsay pour son accueil, son aide et ses conseils précieux. Enfin je tiens à remercier Max Zinke et Pascal Fricke dans l'équipe du Prof. Adam Lange au FMP Berlin, non seulement pour les sessions bière du vendredi après-midi mais aussi et surtout pour avoir réalisé et analysé les expériences de RMN du solide.

Enfin, un dernier merci mais non le moindre à mes parents Christine et Jean-Claude ainsi qu'à mon frère Anthony pour leur soutien indéfectible. Ils m'ont permis d'avancer dans cette épreuve de thèse et m'ont également soutenu dans toutes les épreuves que la vie m'a fait affronter. Ils ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
ABRÉVIATIONS.....	5
INTRODUCTION	9
I. STRUCTURE DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE	10
I.1. <i>Le noyau</i>	10
I.2. <i>L'enveloppe nucléaire et les NPCs</i>	11
I.3. <i>La membrane nucléaire interne : INM</i>	14
I.3.1. Les lamines.....	15
I.3.1.a. Lamines : expression et localisation	15
I.3.1.b. Lamines : maturation	16
I.3.1.c. Lamines : structure et organisation.....	21
I.3.1.d. Lamines : interactions.....	25
I.3.2. Le complexe LINC.....	26
I.3.3. Les protéines LEM.....	34
I.3.4. L'actine, autre partenaire nucléoplasmique des protéines de l'INM	54
II. FONCTIONS DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE	55
II.1. <i>Organisation du génome et régulation de l'expression des gènes</i>	56
II.1.1. Régulation de l'expression des gènes	56
II.1.1.a. Les acteurs de l'activation de la transcription	57
II.1.1.b. Le « gene-silencing »	58
II.1.2. Régulation de la réplication de l'ADN (interaction lamine A - PCNA)	61
II.2. <i>Régulation des voies de signalisation et réponse aux dommages de l'ADN</i>	62
II.2.1. Prolifération, différenciation et apoptose : rôle de l'émerine dans la voie WNT / β -caténine	63
II.2.2. Réponse au stress oxydant : régulation de l'expression de la lamine B1 par la voie p38-MAPK / oct1	64
II.2.3. Réponse aux cassures double-brin de l'ADN : les lamines de types A régulent la voie de réparation NHEJ	65
II.3. <i>Position, forme et taille du noyau et stress mécanique</i>	66
II.3.1. La forme et la taille du noyau : l'interaction lamine-émerine-BAF	66
II.3.2. Protéines nucléaires et propriétés mécaniques du noyau.....	67
II.3.2.a. Le complexe LINC	68
II.3.2.b. L'émerine	70
II.3.2.c. Les lamines	71
II.3.2.d. L'actine	73
III. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES DE L'INM	74
III.1. <i>Modifications post-traductionnelles des lamines</i>	74
III.1.1. Phosphorylations	74
III.1.1.a. Conservation des résidus phosphorylés	74
III.1.1.b. Phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire.....	75
III.1.1.c. Les phosphorylations des lamines ont majoritairement lieu lors de la mitose	75
III.1.1.d. Phosphorylations des lamines et laminopathies	76
III.1.2. Autres modifications post-traductionnelles.....	76
III.2. <i>Modifications post-traductionnelles de l'émerine</i>	77
IV. LES PROTÉINES DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE DANS LES DIFFÉRENTES PATHOLOGIES.....	78
IV.1. <i>Généralités sur les envelopopathies</i>	78
IV.2. <i>Les mutants de l'émerine dans la dystrophie musculaire X-EDMD</i>	80
IV.2.1. Expression des mutants X-EDMD.....	81
IV.2.2. Localisation subcellulaire des mutants X-EDMD.....	82
IV.2.3. Association des mutants X-EDMD à la lamina	83
IV.2.4. Phosphorylation des mutants X-EDMD	84
IV.2.5. Interactions avec les partenaires	85
V. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE THÈSE	86

RÉSULTATS.....	88
I. L'INTERACTION ÉMERINE-LAMINE A AU CŒUR DES FONCTIONS NUCLÉAIRES	89
II. ETUDE DE L'ÉMERINE, UNE PROTÉINE LEM AUX MULTIPLES FONCTIONS.....	94
II.1. <i>Caractérisation structurale de l'émerine</i>	94
II.1.1. L'émerine, une protéine de l'INM majoritairement désordonnée.....	94
II.1.2. L'émerine 1-187 est capable de s'auto-associer <i>in vitro</i>	99
II.1.2.a. L'émerine 1-187 existe <i>in vitro</i> sous forme de monomères, dimères et gros oligomères	99
II.1.2.b. Étude des dimères d'émerine 1-187	102
II.1.2.c. Les monomères d'émerine 1-187 forment des filaments	103
II.1.2.d. Composition structurale des filaments d'émerine 1-187	107
II.1.2.e. Attribution des résidus de l'émerine 1-187 impliqués dans la formation des filaments.....	111
II.1.3. L'émerine semble interagir avec elle-même <i>in vivo</i>	114
II.2. <i>Etude des phosphorylations de l'émerine</i>	115
II.2.1. Phosphorylation de l'émerine <i>in vitro</i>	115
II.2.1.a. Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par Src	117
II.2.1.b. Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par ck1	118
II.2.1.c. Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par ck2.....	119
II.2.1.d. Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par gsk3 β après phosphorylation par ck2	120
II.2.2. Phosphorylation de l'émerine en extraits cellulaires	121
II.3. <i>Etude des variants de l'émerine causant une EDMD</i>	123
II.3.1. Caractérisation de l'impact de 5 mutations causant l'X-EDMD sur les propriétés d'assemblage de l'émerine	123
II.3.2. Étude préliminaire de 3 mutations retrouvées dans le domaine LEM de l'émerine.....	131
II.3.3. Attribution du spectre RMN de l'émerine	132
III. RETOUR SUR L'INTERACTION ÉMERINE – LAMINE A.....	135
IV. ETUDES D'AUTRES INTERACTIONS PROTÉINE-PROTÉINE À L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE, IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE AU STRESS MÉCANIQUE	156
IV.1. <i>Les interactions impliquant l'actine</i>	156
IV.1.1. L'interaction actine – lamine A.....	157
IV.1.2. L'interaction actine – émerine.....	163
IV.2. <i>Les interactions impliquant SUN1</i>	171
IV.3. <i>Les interactions impliquant BAF</i>	178
IV.3.1. L'interaction BAF – émerine.....	181
IV.3.2. L'interaction BAF – lamine A.....	182
CONCLUSION	183
PERSPECTIVES	192
MATÉRIEL ET MÉTHODES	194
RÉFÉRENCES.....	201
ANNEXE.....	211

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Organisation d'une cellule eucaryote	10
Figure 2 : Organisation de l'enveloppe nucléaire.....	11
Figure 3 : Images de microscopie électronique des NPCs.....	12
Figure 4 : Organisation structurale des NPCs.....	13
Figure 5 : Étapes de maturation des lamines.....	16
Figure 6 : Hypothèses de la localisation cellulaire des étapes de maturation des lamines.....	17
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de Zmpste24.....	18
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de Zmpste24 en complexe avec un peptide CSIM.....	19
Figure 9 : Organisation générale des lamines	21
Figure 10 : Association des lamines en dimères parallèles	21
Figure 11: Association des dimères parallèles de lamines en tête à queue	22
Figure 12 : Assemblage des lamines et filaments et plus gros objets	23
Figure 13 : Distribution des lamines de type A et de type B dans le noyau	24
Figure 14 : Régions des lamines de type A impliquées dans la reconnaissance des partenaires	25
Figure 15 : Organisation du complexe LINC.....	27
Figure 16 : Constructions de SUN2 testées en Pulldown contre les peptides KASH.....	28
Figure 17 : Structure d'un protomère de SUN2 522-717.....	29
Figure 18 : Structure trimérique du complexe SUN2 / KASH2	30
Figure 19: Modèle du complexe LINC	31
Figure 20 : Interactions entre le complexe LINC et les protéines de l'INM	32
Figure 21 : Pulldowns SUN 1/2 – lamine A	32
Figure 22 : Pulldowns SUN 1/2 – émerine	33
Figure 23 : Schematic of LEM-domain protein architecture	51
Figure 24 : The LEM domain fold.....	52
Figure 25 : The emerin-BAF interaction	53
Figure 26 : Visualisation de l'actine nucléaire	54
Figure 27 : Organisation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine dans le noyau.....	56
Figure 28 : Organisation du génome humain à proximité de la membrane nucléaire interne	58
Figure 29 : Modèle de l'interaction des LADs avec la lamina via les protéines LEM	59
Figure 30 : Modifications des histones et régulation de la transcription	60
Figure 31 : Modèles de l'interaction IgFold des lamines / PCNA.....	61
Figure 32 : Réponses cellulaires régulées par les protéines de l'INM.....	62
Figure 33 : Modèle de l'inhibition de la voie Wnt / β -caténine par l'émerine	63
Figure 34 : Modèle de l'implication de la voie p38-MAPK dans l'Ataxie Telangiectasie	64
Figure 35 : Protéines de l'enveloppe nucléaire et propriétés mécaniques.....	67
Figure 36 : Enveloppe nucléaire et TAN Lines.....	69
Figure 37 : Système <i>in vitro</i> d'application de stress mécanique sur des noyaux isolés.....	70
Figure 38 : Rôle des phosphorylations de l'émerine dans la résistance à une force	70
Figure 39 : Relation entre composition en lamines et rigidité des tissus	71

Figure 40 : Régulations des lamines de type A dépendantes de tensions mécaniques.....	72
Figure 41 : Diagramme schématique des sites de PTMs démontrées expérimentalement chez l'émerine	77
Figure 42 : Gènes codant pour les protéines de l'INM et envelopathies associées.....	79
Figure 43 : Les mutants de l'EDMD liée à l'X sont localisés dans la partie désordonnée de l'émerine	80
Figure 44 : Quantification des mutants de l'émerine à l'enveloppe nucléaire.....	81
Figure 45 : Localisation subcellulaire des mutants P183H/T et Del95-99.....	82
Figure 46 : Solubilité des mutants P183H, P183T et Del95-99 dans 500 mM NaCl	83
Figure 47 : Étude des phosphorylations de l'émerine Del95-99 en fonction du cycle cellulaire	84
Figure 48 : Effet des mutations causant l'X-EDMD sur la liaison de l'émerine à certains de ses partenaires	85
Figure 49 : L'interaction émerine - lamine A au cœur des processus cellulaires	89
Figure 50 : PLA émerine - lamine A dans des cellules HeLa.....	90
Figure 51 : Filtration sur gel de l'émerine 1-187.....	91
Figure 52 : Gel SDS-PAGE de la purification de la lamine A 389-646.....	92
Figure 53 : Interaction émerine – lamine A 389-646 par RMN.....	93
Figure 54 : L'émerine 1-187 est prédite comme principalement désordonnée.....	94
Figure 55 : Gel SDS-PAGE des fractions bactériennes contenant l'émerine 1-187	95
Figure 56 : Purification de l'émerine par chromatographie d'affinité	96
Figure 57 : Filtration sur gel de l'émerine.....	97
Figure 58 : Gel SDS-PAGE de l'émerine en fin de purification	97
Figure 59 : Spectres RMN à 2D d'un échantillon d'émerine	98
Figure 60 : Première suggestion d'une interaction émerine-émerine	99
Figure 61 : Modèles de l'association intermoléculaire de l'émerine.....	99
Figure 62 : Vitesse de sédimentation de l'émerine 1-187 dans différentes concentrations en NaCl par UCA....	100
Figure 63 : Équilibre de sédimentation de l'émerine 1-187	101
Figure 64 : Graphe correspondant à une analyse par SEC-MALS de l'émerine 1-187	101
Figure 65 : Gel SDS-PAGE de l'émerine dans différentes concentrations de β -mercaptoéthanol.....	102
Figure 66 : La cystéine de l'émerine n'est pas conservée.....	102
Figure 67 : Image de microscopie électronique à transmission de l'émerine.....	103
Figure 68 : L'émerine forme des filaments avec une cinétique dépendante de la température.....	104
Figure 69 : Les monomères d'émerine sont à l'origine de la formation des filaments	105
Figure 70 : Profils de purification par filtration sur gel de l'émerine dialysée dans différentes conditions	106
Figure 71 : Spectre ATR-FTIR de l'émerine avant et après formation des filaments.....	107
Figure 72 : Soustraction des spectres ATR-FTIR des filaments et des monomères d'émerine	108
Figure 73 : Émission de fluorescence de la ThT en présence de filaments d'émerine	109
Figure 74 : Cinétique de formation des filaments d'émerine à 65°C suivie par fluorescence de la ThT.....	110
Figure 75 : Spectre obtenu sur les filaments d'émerine par RMN du solide.....	111
Figure 76 : Approches de protéolyse ménagée envisagées.....	112
Figure 77 : Gels SDS-PAGE de la protéolyse ménagée des filaments de l'émerine.....	113
Figure 78 : Immunofluorescence de l'émerine dans des cellules HeLa.....	114
Figure 79 : PLA de l'émerine dans les cellules HeLa.....	114
Figure 80 : Prédiction de phosphorylation de l'émerine par KinasePhos2	116
Figure 81 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par Src	117

Figure 82 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par ck1	118
Figure 83 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par ck2.....	119
Figure 84 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'émerine par gsk3 β après phosphorylation par ck2.....	120
Figure 85 : Essai de phosphorylation de l'émerine en extraits cellulaires	121
Figure 86 : Expression et solubilité des mutants de l'émerine 1-187 portant les mutations causant l'X-EDMD	123
Figure 87 : Filtration sur gel du WT et des mutants à T = 0 après dialyse dans des conditions réductrices.....	124
Figure 88 : Comparaison des GF du WT et des mutants à T = 0 et T = 24h.....	125
Figure 89 : Images de MET réalisées sur des échantillons d'émerine WT et de mutants EDMD	126
Figure 90 : Cinétiques d'assemblage des filaments du WT et des mutants par fluorescence à pH 6.8.....	127
Figure 91 : Cinétiques d'assemblage des filaments du WT et des mutants par fluorescence à pH 8	128
Figure 92 : Prédiction de structures secondaires de l'émerine par Psipred.....	129
Figure 93 : PLA émerine-émerine sur le WT et les mutants EDMD dans les cellules HeLa	130
Figure 94 : 3 nouveaux mutants causant la CMD sont localisés dans le domaine LEM	131
Figure 95 : Représentation schématique des corrélations observées par RMN	132
Figure 96 : Attribution partielle des résidus de l'émerine sur l'HSQC.....	133
Figure 97 : Superposition des HSQCs de l'émerine dans différentes concentrations en urée.....	134
Figure 98 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 389-646 par RMN	135
Figure 99 : Résidus de la lamine A 389-646 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse	137
Figure 100 : Ratio d'intensité pour chaque pic de l'IgFold de l'expérience RMN d'interaction entre lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse	138
Figure 101 : Gel SDS-PAGE de l'interaction RMN lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse.....	139
Figure 102 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN	140
Figure 103 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse...	141
Figure 104 : Gel SDS-PAGE de l'interaction émerine en sortie de dialyse / lamine A 423-566 par RMN	142
Figure 105 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN n°2.....	143
Figure 106 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse n°2	144
Figure 107 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN n°2 après 6 jours.....	145
Figure 108 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse n°2 après 6 jours.....	147
Figure 109 : Ratio d'intensité pour chaque pic de l'IgFold de l'expérience RMN d'interaction entre la lamine A 423-566 et l'émerine en sortie de dialyse	148
Figure 110 : Analyse des perturbations de déplacement chimique pour l'interaction lamine A 423-566 / émerine en sortie de dialyse après 6 jours	149
Figure 111 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'émerine après 6 jours.....	150
Figure 112 : Topologie du domaine IgFold de la lamine A en interaction avec l'émerine	151
Figure 113 : Évolution de l'échantillon RMN émerine / lamine A 423-566 après 6 jours.....	152
Figure 114 : Interaction émerine en sortie de dialyse / lamine A 423-566 par ITC	153
Figure 115 : PLA émerine-lamine A/C sur le WT et les mutants X-EDMD dans les cellules HeLa.....	154
Figure 116 : Interaction actine G – lamine A par RMN	157
Figure 117 : Gel SDS-PAGE des échantillons RMN de l'interaction lamine A – actine G.....	158

Figure 118 : Répartition des pics de la lamine A 411-553 en fonction de leur comportement dans l'interaction avec l'actine G	159
Figure 119 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'actine G	160
Figure 120 : Topologie du domaine C-terminal de la lamine A en interaction avec l'actine G.....	161
Figure 121 : Interaction émerine-actine G par RMN.....	163
Figure 122 : Résidus de l'émerine impliqués dans l'interaction avec l'actine G.....	164
Figure 123 : Estimation de l'affinité de l'interaction émerine – actine G	165
Figure 124 : Interaction émerine-actine F par RMN	166
Figure 125 : Résidus de l'émerine impliqués dans l'interaction avec l'actine F.....	167
Figure 126 : Estimation de l'affinité de l'interaction émerine – actine F.....	168
Figure 127 : Répartition des pics de l'émerine en fonction de leur comportement dans l'interaction avec l'actine	169
Figure 128 : Organisation structurale de SUN1	171
Figure 129 : Tests d'expression des différentes constructions de SUN1	172
Figure 130 : Interaction entre la lamine A 389-646 et SUN1 (1-139) par RMN	174
Figure 131 : Résidus de la lamine A 389-646 impliqués dans l'interaction avec SUN1.....	175
Figure 132 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec SUN1	176
Figure 133 : Topologie du domaine C-terminal de la lamine A en interaction avec SUN1.....	177
Figure 134 : Modèle de la structure du complexe BAF ₂ -émerine.....	178
Figure 135 : Purification de BAF	179
Figure 136 : Tests de filtration sur gel de BAF dans différentes concentrations en NaCl.....	180
Figure 137 : Interaction BAF - émerine par RMN	181
Figure 138 : Interaction lamine A 389-646 ¹⁵ N - BAF par RMN	182
Figure 139 : Gel SDS-PAGE de l'interaction par RMN entre la lamine A 389-646 ¹⁵ N et BAF	182
Figure 140 : Interactions protéine-protéine à l'INM, importantes pour les propriétés mécaniques du noyau	184
Figure 141 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'émerine, l'actine et SUN1.....	188
Figure 142 : Hypothèse de complexes à 3 protéines.....	189
Figure 143 : Résumé schématique des interactions connues et observées dans cette thèse	190

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Adenomatous polyposis coli
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
ATR-FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec réflexion totale atténuée
BSA	Bovine serum albumine ou Albumine de sérum bovin
C-NHEJ	Classic-Non Homologous End-Joining
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CMD	Cardiomyopathie dilatée
CMT2	Maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2
CSP	Chemical shift perturbation ou Perturbation du déplacement chimique
D.O.	Densité optique
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DLS	Dynamic light scattering ou Signal de diffusion dynamique de la lumière
DMSO	Dimethylsulfoxyde
dRI	Differential refractive index ou Mesure de l'indice de réfraction différentiel
DSB	Double-Strand Break ou Cassure double-brin
DTGS	Détecteur infrarouge en sulfate de triglycine
DTT	Dithiothréitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDMD	Emery-Dreifuss muscular dystrophy ou Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EN	Enveloppe nucléaire
FMP	Leibniz-institut für molekulare pharmakologie
FPLD	Familial partial lipodystrophy ou Lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan
GCN4	Région en super hélice du facteur de transcription de levure Gcn4, formant spontanément des trimères et forçant donc la construction attachée à trimériser
GF	Filtration sur gel
GFP	Green fluorescent protein
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndrome
HR	Homologous recombination ou Recombinaison homologue
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
IF	Immunofluorescence
IFCM	Intermediate filament consensus motif
IgFold	Domaine C-terminal des lamines adoptant un repliement de type immunoglobuline
INM	Inner nuclear membrane ou Membrane nucléaire interne
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITC	Titration calorimétrique isotherme
KASH	Klarsicht, Anc-1, Syne-1 homology domain
Kav	Coefficient de distribution
LAD	Lamina associated domain
LAS	Lamina associated sequence

LBSR	Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie
LEBS	Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales
LEM	LAP2, Emerin and MAN1 domain
LGMD	Limb girdle muscular dystrophy ou Dystrophie musculaire des ceintures
LGMD1B	Limb girdle muscular dystrophy type 1B
LINC	Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton
LS	Laser scattering ou Signal de diffraction laser
MAD	Dysplasie mandibulo-acrale
MAD-B	Dysplasie mandibulo-acrale de type B
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCT	Détecteur infrarouge en mercure, cadmium et tellure
MEF	Fibroblaste embryonnaire de souris
MS	Syndrome métabolique ou Laminopathie de type Decaudin-Vigouroux
NLS	Nuclear localization signal ou Signal de localisation nucléaire
NMR	Nuclear magnetic resonance
nOe	Effet Overhauser nucléaire
NP/CP	Nucléoplasme/Cytoplasme
NPC	Nuclear pore complex ou Pore nucléaire
O-GlcNac	O-N-acétylglucosaminylation
ONM	Outer nuclear membrane ou Membrane nucléaire externe
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
pI	Point isoélectrique

PLA	Proximity ligation assay
PM	Poids moléculaire
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PTM	Modification post-traductionnelle
RD	Dermopathie restrictive
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT-PCR	Reverse transcription - Polymerase chain reaction
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis with SDS
SEC-MALS	Size exclusion chromatography with multi-angle light scattering
Src	Tyrosine kinase Src
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV	Tobacco etch virus protease
ThT	Thioflavine
TM	Transmembranaire
UCA	Ultracentrifugation analytique
VS	Versus
WT	Wild Type
X-EDMD	Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss liée à l'X

INTRODUCTION

I. STRUCTURE DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE

I.1. LE NOYAU

Contrairement aux procaryotes, constitués d'un seul compartiment intracellulaire bordé d'une membrane plasmique, les cellules eucaryotes sont composées d'une multitude de compartiments (Figure 1). Ces compartiments, appelés organites, possèdent un ensemble d'enzymes et de molécules ainsi qu'un système de transport qui leur sont spécifiques, ce qui leur confère des propriétés structurales et fonctionnelles propres et distinctes des autres compartiments.

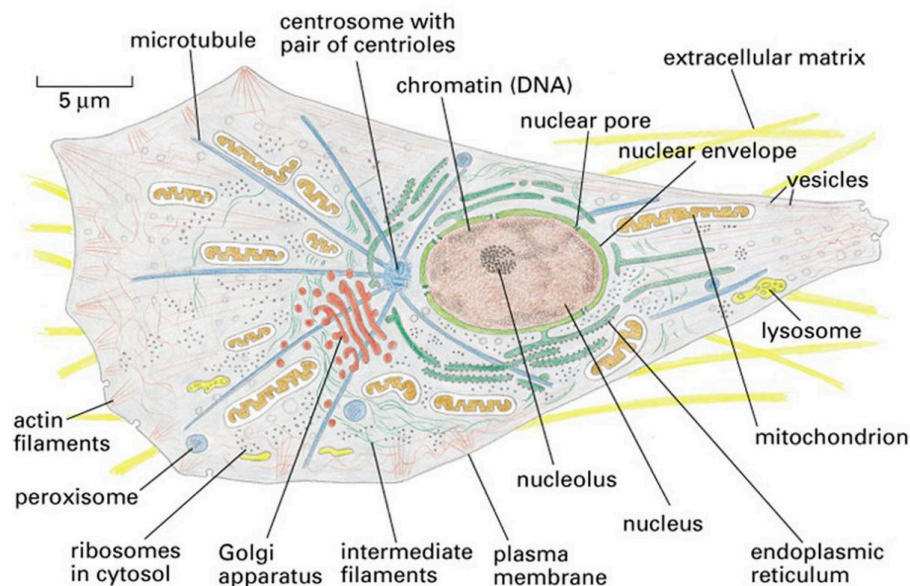


Figure 1 : Organisation d'une cellule eucaryote ¹

Le plus grand des organites cellulaires est le noyau, avec ses 10 à 20 µm de diamètre. Il stocke l'information génétique sous forme de longues molécules d'ADN, connues sous le nom de chromosomes. Ses fonctions majeures sont la conservation de l'intégrité du génome et la régulation de l'activité cellulaire par la régulation de l'expression des gènes.

I.2. L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE ET LES NPCS

L'enveloppe nucléaire sépare le cytoplasme du nucléoplasme. Elle est constituée de deux couches lipidiques concentriques appelées membrane nucléaire interne (INM : Inner nuclear membrane) et membrane nucléaire externe (ONM : Outer nuclear membrane). Ces deux membranes nucléaires sont séparées par un espace périnucléaire de 30 à 50 nm d'épaisseur, en continuité avec la lumière du réticulum endoplasmique (Figure 2).

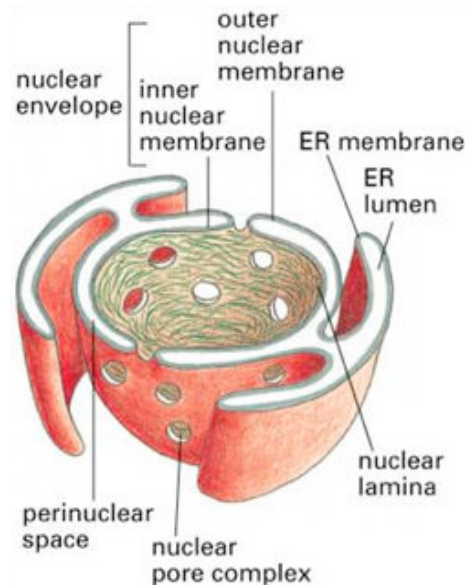


Figure 2 : Organisation de l'enveloppe nucléaire ¹

La membrane nucléaire externe partage les mêmes fonctions que le réticulum endoplasmique. La membrane nucléaire interne est tapissée de filaments intermédiaires, formés par les protéines nommées lamines, assemblés pour former la lamina nucléaire. Cette lamina interagit à la fois avec d'autres protéines de l'INM et avec la chromatine.

L'enveloppe nucléaire est dotée d'une perméabilité sélective. En effet les pores nucléaires, qui traversent les deux membranes et contrôlent la circulation des macromolécules entre le nucléoplasme et le cytoplasme et inversement, constituent la seule voie de communication entre le noyau et le cytoplasme. Le nombre de pores varie de 4 000 à 6 000 dans une cellule de mammifère.

Formés par la jonction des membranes externe et interne, ces pores nucléaires ou NPCs (Nuclear Pore Complex) sont distribués sur toute la surface de l'enveloppe nucléaire et sont constitués de grands complexes d'une cinquantaine de protéines, appelées nucléoporines, dont certaines sont très spécifiques comme gp210 et POM121 ². Un pore apparaît comme un anneau d'une centaine de nanomètres de diamètre par microscopie électronique (Figure 3).

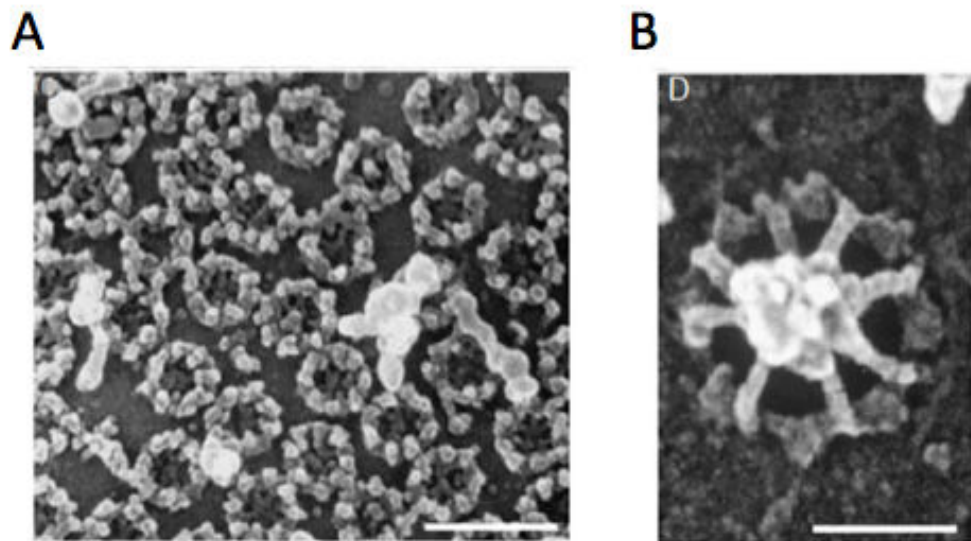


Figure 3 : Images de microscopie électronique des NPCs ³

Clichés de microscopie électronique à balayage à émission de champ d'une enveloppe nucléaire d'ovocytes. **A.** Face cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire (barre d'échelle à 200 nm). **B.** Cliché d'un pore unique, observé sur la face nucléoplasmique (barre d'échelle à 50 nm).

En réalité, un NPC est composé de deux anneaux, un cytoplasmique et l'autre nucléoplasmique ayant tous deux une architecture d'ordre huit. Ces deux anneaux sont reliés par des rayons issus de chacune des huit sous-unités, formant ainsi une cage cylindrique ⁴. Chaque sous-unité de l'anneau cytoplasmique émet dans le cytoplasme un filament court alors que chacune des sous-unités de l'anneau nucléoplasmique émet un filament plus long qui se fixe sur un anneau distal de plus faible diamètre, formant ainsi un « panier nucléaire » (Figure 4).

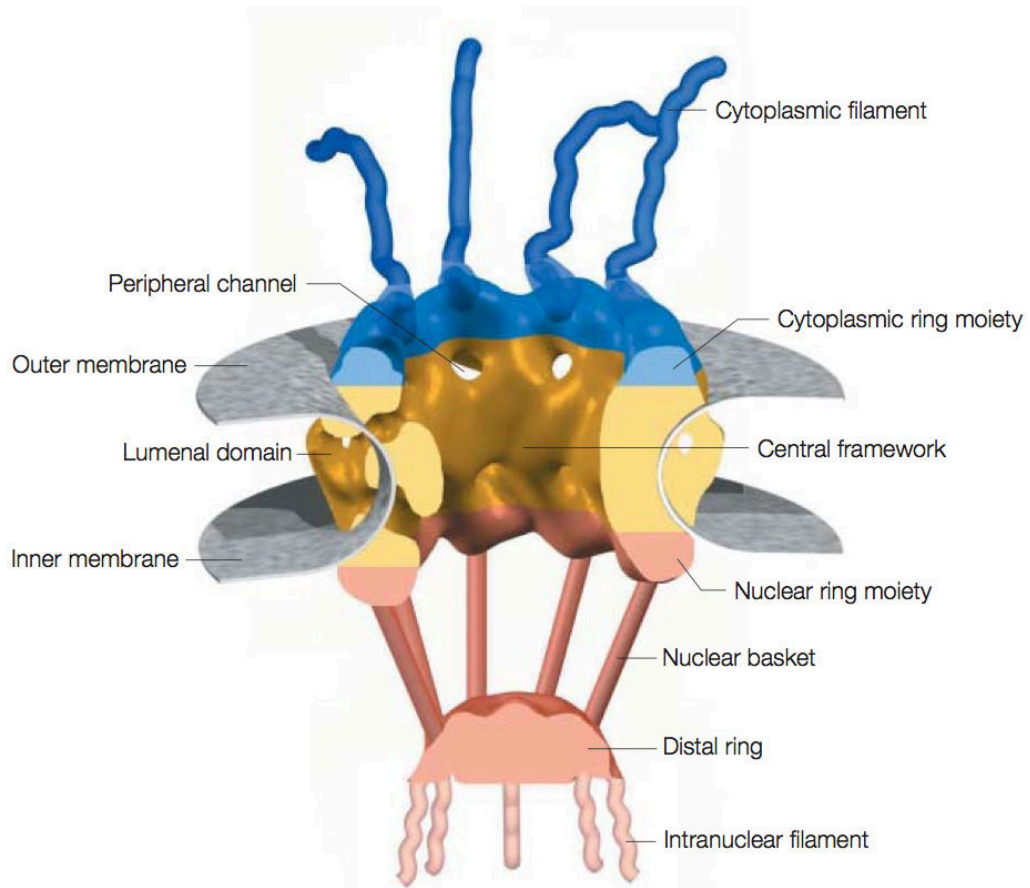


Figure 4 : Organisation structurale des NPCs ⁴

Représentation schématique du modèle consensus d'un NPC en 3D. Le NPC contient différents éléments structuraux, incluant le « central framework », l'anneau cytoplasmique avec ses filaments courts et l'anneau nucléaire avec son « panier nucléaire ».

Les NPCs sont enchâssés dans l'enveloppe nucléaire et sont probablement stabilisés par des interactions avec les protéines membranaires de l'ONM et de l'INM ainsi qu'avec la lamina. En effet, une fois assemblés, les NPCs apparaissent immobiles dans l'enveloppe nucléaire en interphase. Une étude chez *S.cerevisiae* (qui ne possède pas de lamina) a montré que les pores nucléaires étaient beaucoup plus mobiles dans la membrane de cette levure ^{5,6}. Par ailleurs, des interactions entre les nucléoporines Nup153 et Nup53 et les lamines ont été également découvertes ^{7,8}.

I.3. LA MEMBRANE NUCLÉAIRE INTERNE : INM

Il existe au moins 80 protéines différentes localisées dans la membrane nucléaire interne (INM) des cellules mammifères en interphase ⁹, mais seulement quelques unes ont été étudiées jusqu'alors. Ces protéines sont synthétisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) rugueux et diffusent latéralement pour atteindre la membrane nucléaire interne, où elles interagissent avec la lamina et/ou la chromatine. Des contraintes de taille, imposées par les pores nucléaires, restreignent l'accès à l'INM uniquement aux protéines ayant un domaine nucléoplasmique de moins de 60 kDa. Les données disponibles dans la littérature sur l'architecture de la membrane nucléaire interne sont peu abondantes. Cependant, on peut noter que les protéines de cette membrane nucléaire interne sont soit filamentaires (comme les lamines), soit ancrées à la membrane (comme l'émerine, MAN1 ou encore les protéines SUN). Les interactions entre ces protéines pourraient être régulées à la fois par des événements d'oligomérisation, comme récemment montré pour les protéines SUN ¹⁰ et par des modifications post-traductionnelles (PTMs : Post-translational modifications), comme montré pour les lamines ¹¹.

I.3.1. Les lamines

I.3.1.a. Lamines : expression et localisation

Les lamines sont présentes chez tous les métazoaires connus à ce jour mais sont absentes chez les organismes unicellulaires et les plantes ¹². La plupart des invertébrés ne possèdent que des lamines de type B alors que les vertébrés expriment les lamines de type A et de type B ¹³.

Chez ces vertébrés, alors qu'au moins un type de lamine B est exprimé dans toutes les cellules tout au long du développement (B2 est exprimée à un taux relativement constant durant le développement alors que B1 est principalement exprimée au début du développement et son expression est corrélée avec la prolifération), les lamines de type A sont exprimées seulement pendant ou après la différenciation et leur niveau d'expression augmente lors de la fin de la différenciation et l'arrêt de la croissance ^{14, 15, 16}.

Les lamines de type A et B diffèrent aussi par leur comportement et leur distribution spatiale. Alors que la majeure partie des différentes isoformes de lamines reste associée à la membrane nucléaire interne, ces protéines sont aussi présentes en plus faible quantité et surtout en interphase, dans le nucléoplasme ^{17, 18}. Pendant la mitose par exemple, l'enveloppe nucléaire se désassemble en particulier grâce à la phosphorylation des lamines par des kinases mitotiques et est reconstituée du fait de leur déphosphorylation par la phosphatase PP1A ^{19, 20}. Lors du désassemblage, les lamines de type A deviennent solubles et se dispersent dans le cytoplasme alors que les lamines de type B restent associées à la membrane nucléaire, qui est alors sous forme de vésicules, à cause de leur état farnésylé ^{21, 22}.

I.3.1.b. Lamines : maturation

Chez l'homme, 3 gènes codent pour les lamines : le gène *LMNA* qui code pour les 4 lamines de type A (A, C, A_{Δ10} et C₂), le gène *LMNB1* qui code pour la lamine B1 et le gène *LMNB2* qui code pour les lamines B2 et B3.

Les lamines sont d'abord synthétisées sous forme de prélamines et subissent des modifications post-traductionnelles (PTMs) ou étapes de maturation (Figure 5) dont l'un des rôles serait leur ciblage vers l'enveloppe nucléaire²³. Ces modifications ont lieu au niveau d'un motif caractéristique d'acides aminés en C-terminal des prélamines, appelé boîte CAAX, où C est une cystéine, A correspond à un acide aminé aliphatique et X représente n'importe quel résidu.

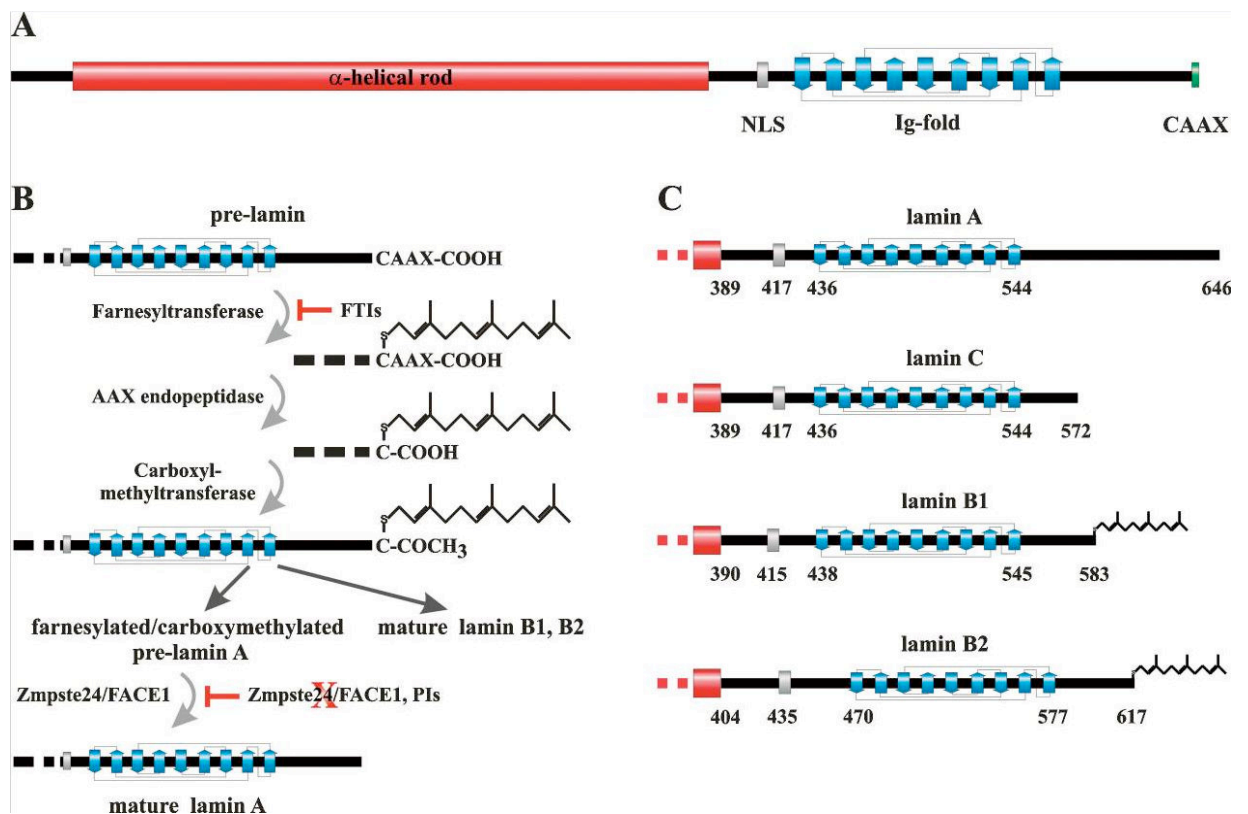


Figure 5 : Étapes de maturation des lamines²³

Les différents types de lamines sont d'abord farnésylés par une farnésyltransférase sur la cystéine de la boîte CAAX par ajout d'une queue hydrophobe d'hydrocarbures, appelée farnésyle. Le motif AAX est ensuite clivé par une endopeptidase (Rce1 et/ou Zmpste24). Enfin, la cystéine est carboxyméthylée, un processus catalysé par l'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase (Icmt).

Les lamines de types B ne subissent pas de modification supplémentaire et sont donc farnésylées et carboxyméthylées de manière permanente. Les lamines de type A subissent une étape de maturation supplémentaire, un clivage des 15 acides aminés C-terminaux par Zmpste24 (également appelée FACE1) afin de former les lamines de type A matures, ayant perdu leurs farnésylation et carboxyméthylation.

Comme pour toutes les protéines, l'étape de transcription des lamines a lieu dans le noyau. L'ARNm produit va ensuite être importé dans le cytoplasme et traduit en protéine prélamine. Les protéines membranaires Rce1, Zmpste24 et Icmt sont retrouvées à la fois dans la membrane externe du réticulum endoplasmique (avec leur site catalytique faisant face au cytoplasme) et dans la membrane nucléaire interne (avec leur site catalytique faisant face au nucléoplasme) permettant ainsi la maturation des lamines d'avoir lieu soit dans le cytoplasme (Figure 6, gauche) soit dans le nucléoplasme (Figure 6, droite) ²⁴. Je référerai donc au compartiment faisant face au site catalytique de ces enzymes comme NP/CP (Nucléoplasme/Cytoplasme).

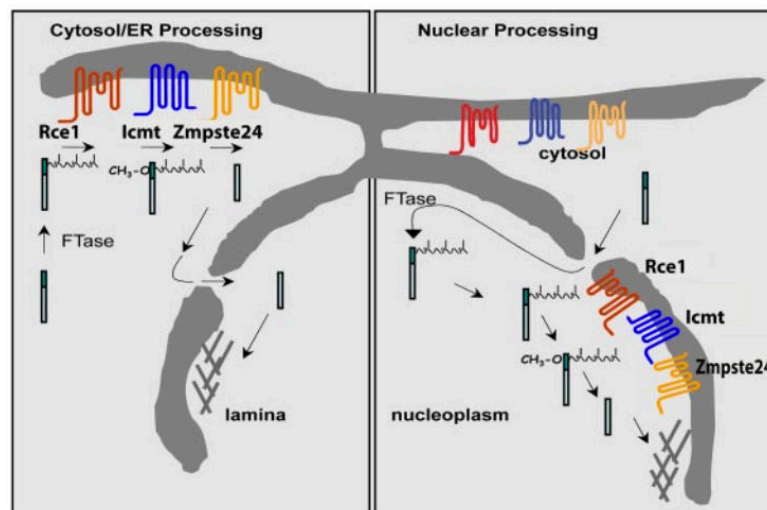


Figure 6 : Hypothèses de la localisation cellulaire des étapes de maturation des lamines ²⁴

La métalloprotéase Zmpste24 intervient à deux reprises dans la maturation des lamines et son gène est muté dans certaines envelopathies à phénotype progéroïde, caractérisées par un vieillissement accéléré ^{25, 26, 27}. Au niveau moléculaire, l'incapacité de Zmpste24 à transformer la prélamine A en lamine A conduit à une accumulation de prélamine A farnésylée et ancrée à la membrane.

La résolution de la structure tridimensionnelle de Zmpste24²⁸, seule ou en complexe avec un peptide CSIM (correspondant au motif CAAX), a permis de déterminer les détails mécanistiques des processus de maturation de la lamine A et d'imaginer comment des mutations dans le gène codant pour Zmpste24 peuvent aboutir à des syndromes progéroïdes.

Zmpste24 adopte une structure en tonneau grâce à 7 hélices transmembranaires (numérotées de 1 à 7 sur la Figure 7) renfermant une large chambre de 12 000 Å³ qui traverse la membrane externe du RE ou l'INM de part et d'autre. Cette chambre possède 4 ouvertures permettant l'entrée d'un substrat à partir du NP/CP ou de la membrane. Sur la face NP/CP la chambre est scellée par un domaine de type protéase à zinc M48 (« protease domain » sur la Figure 7) inséré entre les hélices membranaires 5 et 6. Sur la face luménale, le bas de la chambre est scellé par 3 hélices α : Lumenal Helix 1 et 2 (LH1, LH2) et la partie luménale de l'hélice transmembranaire 7 (7A). Le site catalytique de Zmpste24 se situe sur la face NP/CP de la chambre, au niveau des résidus N265 (feuillet β 3), H459 (boucle entre MH5 et MH6) et R465 (MH6).

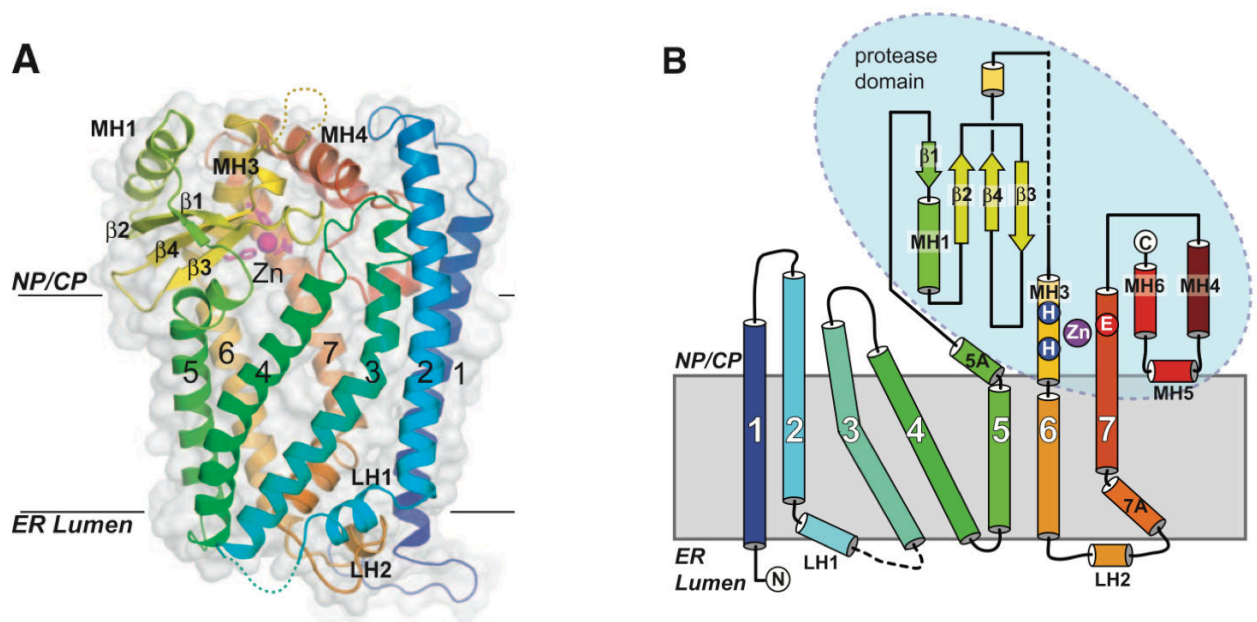


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de Zmpste24²⁸

A. Représentation en cartoon de la structure de Zmpste24, PDB : 4AW6. MHX correspond aux hélices α du domaine protéase et LHX aux hélices α du domaine luménal. Les hélices α transmembranaires (TMHX) sont représentées par des chiffres et les feuillets β sont notés β X. **B.** Représentation schématique de la structure de Zmpste24 et localisation nucléaire de chaque structure secondaire. ER = Réticulum endoplasmique, NP/CP = Nucléoplasme/Cytoplasme.

Les auteurs ont proposé une ouverture, entre TMH5, TMH6 et la structure en tête d'épingle formée par les feuillettes $\beta 3$ et $\beta 4$, comme étant la voie d'entrée et de sortie la plus favorable à la prélamine A. Cette ouverture est la plus favorable car elle permettrait l'alignement correct des résidus C-terminaux de la prélamine A (boîte CAAX) avec le site catalytique de Zmpste24. Les résidus clivés (AAX) pourraient sortir via l'ouverture entre TMH1 et TMH2. Le domaine C-terminal de la prélamine A partiellement mûré pourrait alors soit sortir par la même ouverture que celle par laquelle il est entré, soit être redirigé vers la membrane à l'aide d'autres ouvertures. Ce domaine serait alors carboxyméthylé par Icmt avant de se réinsérer dans la chambre de Zmpste24 et de subir le clivage final des 15 derniers acides aminés.

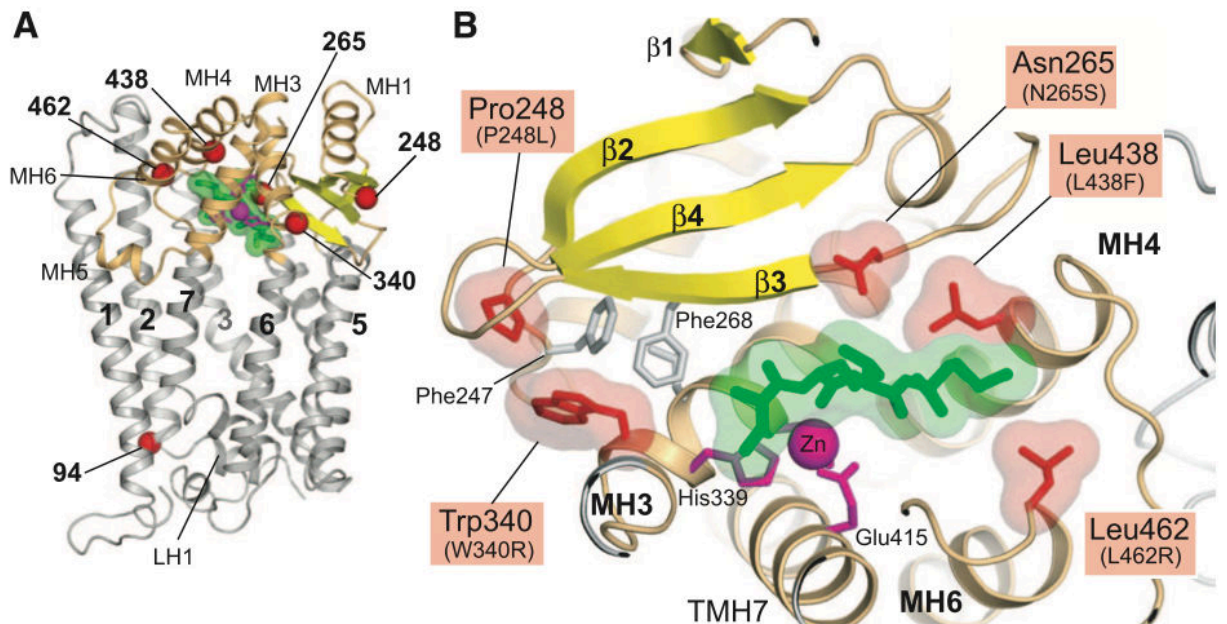


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de Zmpste24 en complexe avec un peptide CSIM ²⁸

A. Représentation en cartoon de la structure du complexe entre Zmpste24 (gris, jaune et orange) et le peptide CSIM (vert), PDB 2YPT. MHX correspond aux hélices α du domaine protéase et LHX aux hélices α du domaine luménal. Les hélices α transmembranaires (TMHX) sont représentées par des chiffres en gras. Les mutations de Zmpste24 causant des syndromes progéroïdes sont représentées par des sphères rouges. **B.** Zoom sur le domaine protéase.

Les mutations dans Zmpste24 causant des syndromes progéroïdes sont représentées sur la Figure 8. Les mutations L94P, P248L, N265S et W340R sur Zmpste24 ont été retrouvées chez des patients souffrant de Dysplasie Mandibulo-Acrale de type B (MAD-B), une envelopathie à phénotype progéroïde, et conduisent à une activité protéase de Zmpste24 faible ou inexistante.

La mutation L94P, localisée dans la partie basse du tonneau d'hélices, pourrait déstabiliser la structure de la protéine ou encore jouer un rôle dans la liaison au substrat ou le relargage des produits de clivage. L'asparagine 265 (N265) est localisée au niveau du site de fixation et de catalyse du substrat. Le tryptophane 340 (W340) est localisé sur la partie C-terminale de l'hélice MH3 contenant le motif de liaison au peptide où il forme une surface hydrophobe avec d'autres résidus comme L337, F247 et F268. Cette surface hydrophobe permet le positionnement de l'hélice MH3 et des histidines du motif de liaison dans le site actif de l'enzyme. Les mutations W340R et P248L pourraient affecter le placement correct du peptide à cliver dans le site catalytique. Enfin, les mutations L438F et L462R ont été observées chez des patients souffrant d'autres envelopathies : le Syndrome Métabolique (MS ou laminopathie de type Decaudin-Vigouroux) et la Dermopathie Restrictive (RD) respectivement. Les deux résidus mutés se trouvent au sein du domaine métalloprotéase et sont adjacents au domaine de liaison au peptide. Les deux mutations qui induisent l'insertion de chaînes latérales beaucoup plus grosses pourraient affecter l'accessibilité du site de liaison de Zmpste24 au peptide cible.

I.3.1.c. Lamines : structure et organisation

A partir de l'analyse de leur séquence on peut déduire que les lamines comportent un petit segment N-terminal de 24 résidus (« Head » ou domaine tête), suivi par un grand domaine de 40 kDa sous forme de tige en hélices α (composé des régions Coil1 et Coil2 séparées par un linker) et une région queue (ou « tail ») en C-terminal de 20 kDa ²⁹ (Figure 9). La queue C-terminale des lamines est principalement déstructurée mais possède un domaine replié de type immunoglobuline que je nommerai « IgFold » dans cette thèse. Les structures de l'IgFold ^{30, 31}, ainsi que du Coil 2 ^{32, 33} ont été résolues soit par RMN soit par cristallographie aux rayons X.

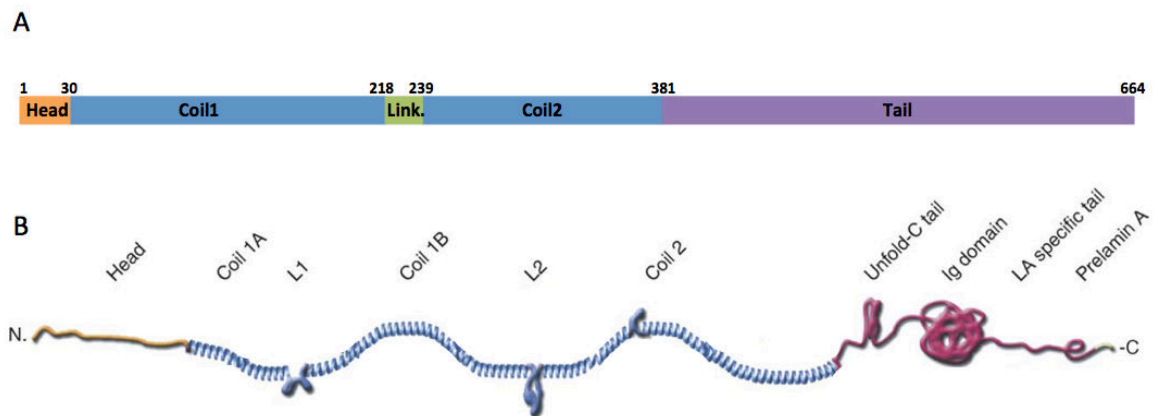


Figure 9 : Organisation générale des lamines ^{34, 35}

A. Représentation schématisée des différents domaines des monomères de lamine. B. Représentation schématisée des structures secondaires présentes dans ces différents domaines.

Il a été montré ³⁵ que ce sont les domaines sous forme de tige en hélices α (résidus 30-381) qui sont responsables de l'association des lamines en dimères parallèles (Figure 10).

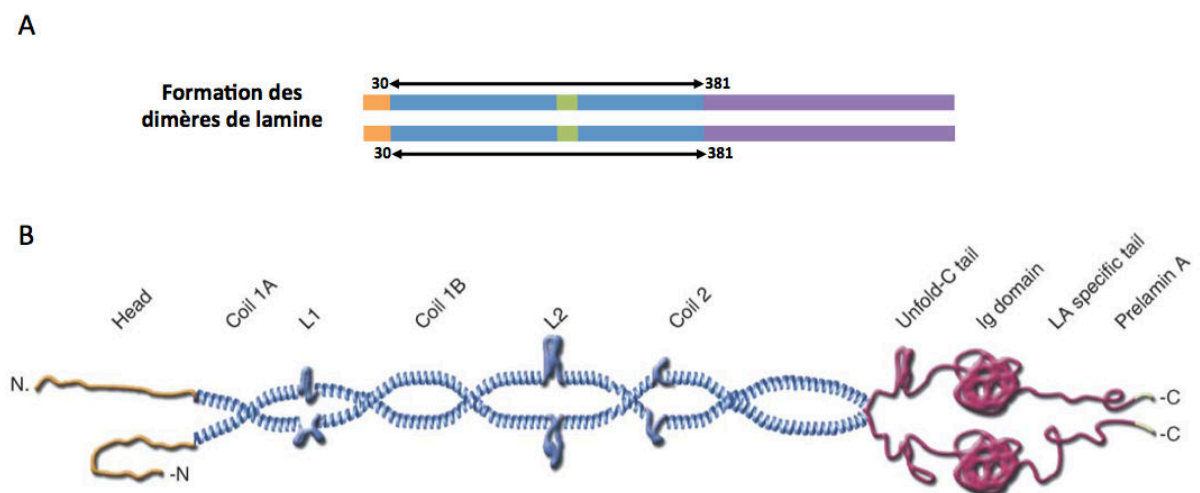


Figure 10 : Association des lamines en dimères parallèles ^{34, 35}

A. Représentation schématisée des domaines des lamines impliqués dans la formation des dimères. B. Représentation schématisée des structures secondaires présentes dans les dimères de lamines.

L'association de deux dimères parallèles entre eux se fait selon un modèle antiparallèle tête à queue où la région 1-263 (domaine « Head » N-terminal, Coil1 et extrémité N-terminale du Coil2) d'une lamine va s'associer à la région 264-402 (domaine C-terminal du Coil2 et 21 résidus chargés et très conservés de la région N-terminale du domaine queue C-terminal) de l'autre lamine (Figure 11A). La lamine B2 de poulet a été produite en *E.coli*, purifiée à partir des corps d'inclusion et observée au microscope électronique à transmission ³⁶ (Figure 11B). Les dimères de lamines semblent bien s'associer selon un modèle tête à queue. Les mêmes images ont été obtenues sur la lamine A de xénope ³⁷.

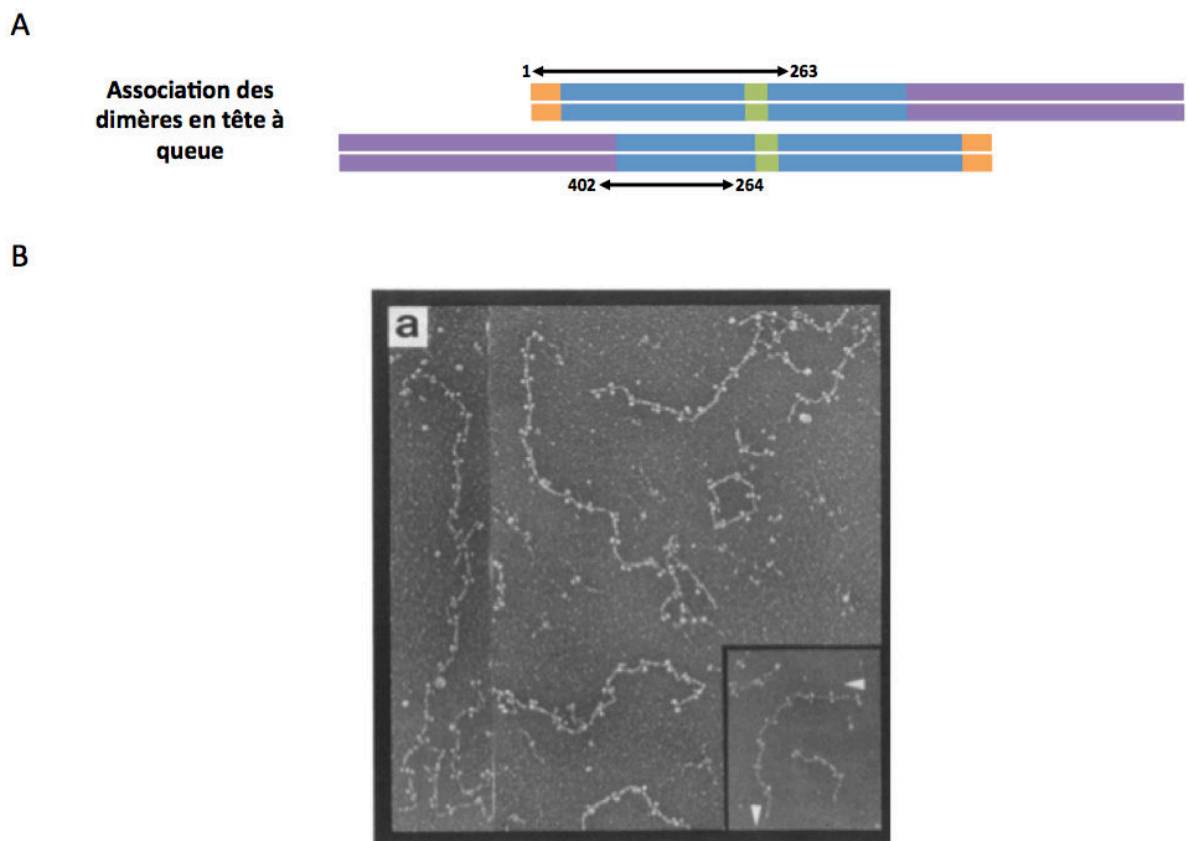


Figure 11: Association des dimères parallèles de lamines en tête à queue ^{35, 36}

A. Représentation schématique des domaines des lamines impliqués dans l'association des dimères entre eux. **B.** Clichés de microscopie électronique à transmission de la lamine B2 de poulet recombinante dialysée au moins 1 heure à température ambiante dans 25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT et 1 mM PMSF. Contrastant utilisé : 0.75% de formate d'uranyle à pH 4.25.

Les lamines s'assemblent ensuite en filaments de 10 nm de diamètre structuralement semblables aux autres filaments intermédiaires (Figure 12A). Ces filaments vont ensuite former des câbles plus larges, probablement par une association latérale (Figure 12B). Enfin un arrangement paracristallin semble apparaître avec le temps, probablement dû à un empilement des domaines C-terminaux (queues) des lamines (Figure 12C, D).

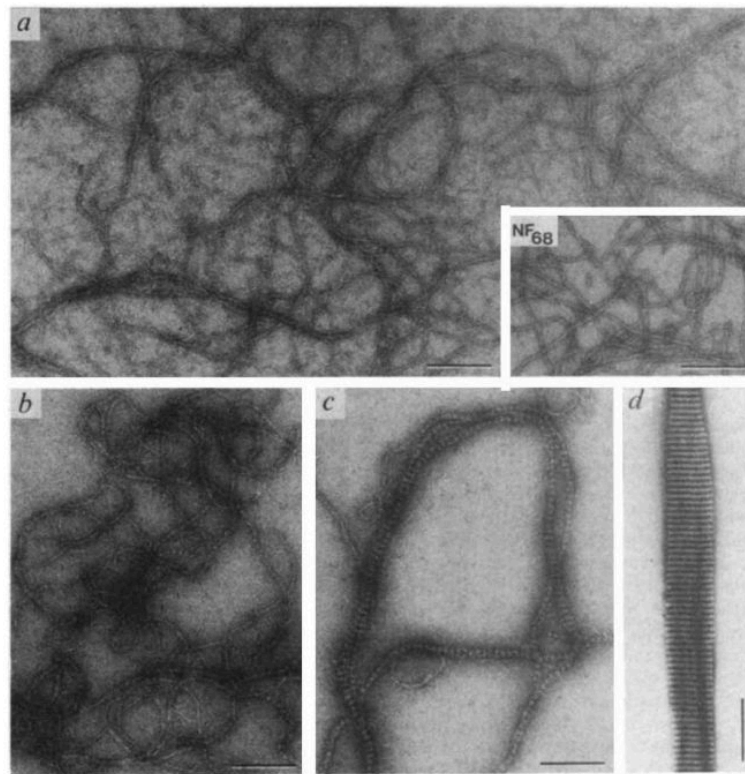


Figure 12 : Assemblage des lamines et filaments et plus gros objets³⁸

Des lamines de type A purifiées à partir de foie de rat ont été dialysées à 0.25 mg/mL dans un tampon 25 mM MES pH 6.5, 150-175 mM NaCl et 1 mM DTT et incubées à 37°C. Des aliquots ont été prélevés à différents temps d'incubation et observés en microscopie électronique en coloration négative en utilisant 0.75% de formate d'uranyle comme contrastant. **A.** t = 0 min. **B.** t = 15-30 min. **C.** t = 30-60 min. **D.** t > 60 min. **NF₆₈** correspond à un autre type de filament intermédiaire ; les neurofilaments de bœuf.

Les détails moléculaires de l'assemblage et de la structure finale des lamines restent aujourd'hui inconnus. Cependant, il a été observé que de chaque côté du domaine « tige » des lamines se trouvent des segments fortement conservés au sein des filaments intermédiaires, appelés IFCM1 et IFCM2, qui pourraient être impliqués dans l'association des oligomères de lamines en filaments. Il a également été montré que les domaines IgFold des lamines de type A pouvaient dimériser dans une position antiparallèle grâce à un pont disulfure entre les deux cystéines 522 localisées à la surface de ces structures globulaires³⁹. Il est donc possible que deux IgFolds provenant de deux molécules de lamine distantes appartenant à deux filaments adjacents puissent interagir afin de former les câbles de lamines.

Ces filaments intermédiaires vont ensuite former un réseau, la lamina, qui tapisse la membrane nucléaire interne. Les lamines de type A et les lamines de type B forment des réseaux de filaments séparés ^{40, 41}, qui restent cependant enchevêtrés et interagissent les uns avec les autres ⁴¹ (Figure 13).

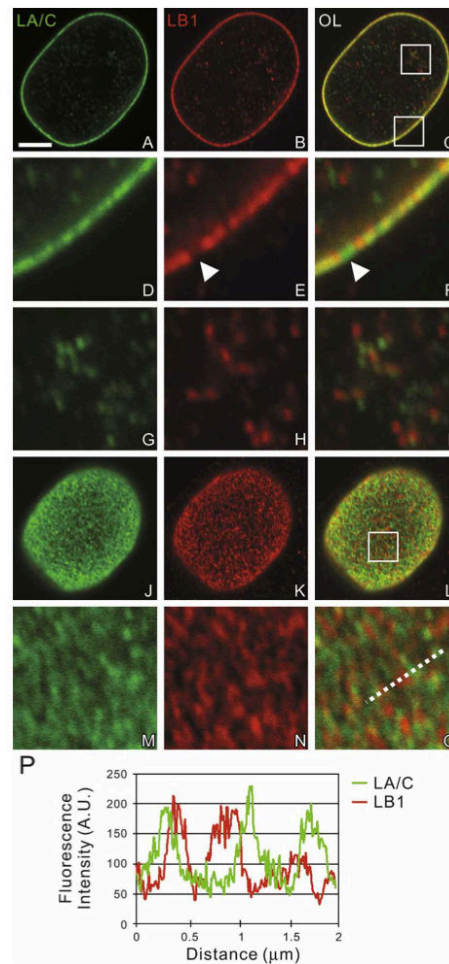


Figure 13 : Distribution des lamines de type A et de type B dans le noyau ⁴¹

Les distributions des différentes lamines sont observées par immunofluorescence confocale avec double marquage : les lamines A/C (en vert) et les lamines B1 (en rouge). Les zones correspondantes aux cadres blancs sont zoomées 5 fois dans les figures D, E, F, G, H, I et M, N, O. Les images A à I correspondent à une section équatoriale et les images J à O correspondent à la surface nucléaire. On constate que les lamines forment des réseaux séparés et distincts avec quelques régions de superposition.

I.3.1.d. Lamines : interactions

Les lamines A/C interagissent avec de nombreux partenaires (Figure 14). Ces interactions peuvent être impliquées dans l'architecture du noyau, l'attachement de la chromatine, la régulation de l'expression des gènes et la régulation des voies de signalisation.

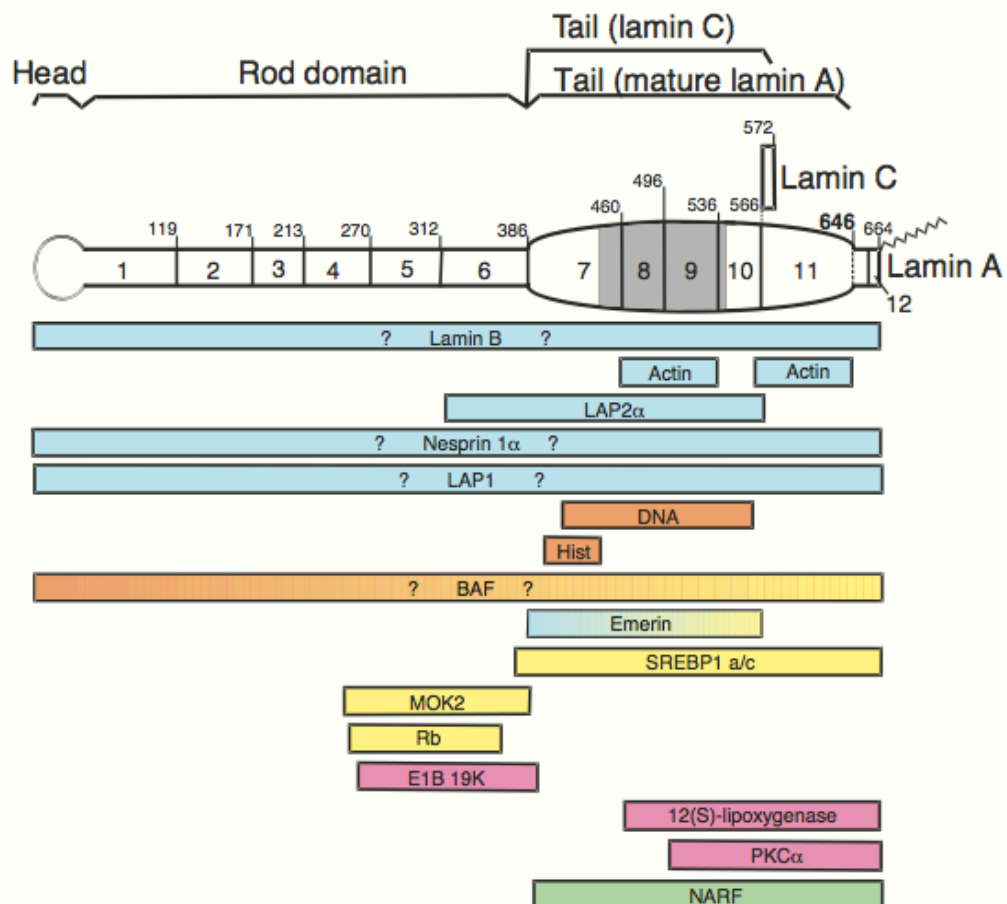


Figure 14 : Régions des lamines de type A impliquées dans la reconnaissance des partenaires ⁴²

Représentation schématique des lamines de type A en noir avec leurs différents domaines : le domaine tête (Head), le domaine tige (Rod domain) et le domaine queue (Tail). Les barres en dessous représentent les régions des lamines de type A impliquées dans les interactions avec les partenaires. Les partenaires sont colorés en fonction du processus dans lequel ils sont impliqués ; architecture du noyau (bleu clair), attachement de la chromatine (orange), régulation de l'expression des gènes (jaune) et régulation des voies de signalisation (rose).

I.3.2. Le complexe LINC

L'INM et l'ONM sont biochimiquement différentes. Il existe plus de 50 protéines intégrales différentes tapissant l'enveloppe nucléaire, dont la plupart résident au niveau de l'INM grâce à des interactions avec la lamina et les autres protéines de l'INM.

En ce qui concerne l'ONM, étant la continuité du réticulum endoplasmique, il a longtemps été pensé que sa composition était similaire à celle de la membrane de réticulum endoplasmique (RE). Or, il existe de nombreuses protéines, notamment celles qui sont responsables du positionnement du noyau dans la cellule, qui sont uniquement localisées dans l'ONM et ne sont pas retrouvées dans le RE ⁴³.

Parmi ces protéines on trouve les nesprines, produits de deux gènes différents *nesprine-1* et *nesprine-2* (également appelées *syne-1* et *syne-2*, *Nuance*, *Myne-1*, *ENAPTIN* ou *ANC-1*). Ces protéines sont constituées d'une région N-terminale cytoplasmique liant l'actine, d'un domaine central contenant des répétitions de séquence de type spectrine et impliqué dans l'auto-association de la protéine et enfin dans certaines nesprines, une région C-terminale contenant un domaine KASH (Klarsicht, Anc-1, Syne-1 Homology) de 60 résidus (20 résidus sont localisés dans la membrane nucléaire externe et les 40 derniers résidus, majoritairement des prolines, sont dans l'espace périnucléaire).

Les nesprines ont la capacité de diffuser latéralement au sein de l'ONM. Certaines d'entre-elles, les plus petites isoformes, peuvent d'ailleurs atteindre l'INM en traversant les pores nucléaires et interagir avec l'émerine et les lamines de type A ⁴⁴. D'autres ont même été retrouvées dans les membranes d'autres organites tels que le réticulum endoplasmique ou les mitochondries ⁴⁵.

Les grandes isoformes sont beaucoup moins mobiles. Elles interagissent avec les filaments d'actine du côté cytoplasmique et avec les protéines de l'INM appelées protéines SUN dans l'espace périnucléaire (Figure 15)^{43, 46}. Le complexe entre les nesprines et les protéines SUN est appelé LINC (LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) et permet la transmission de forces entre le cytosquelette et le nucléosquelette, importantes pour le mouvement des chromosomes méiotiques, la migration nucléaire, le positionnement du centrosome ou encore l'organisation globale du cytosquelette.

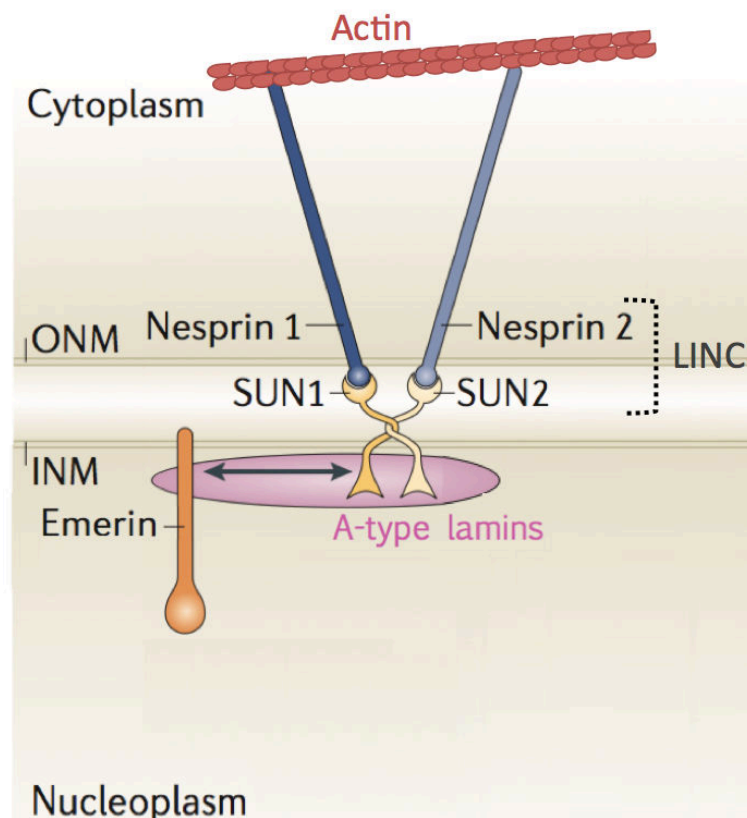


Figure 15 : Organisation du complexe LINC. Adapté de⁴⁷

Schéma représentant l'enveloppe nucléaire et le complexe LINC (Nesprine 1/2 – SUN 1/2) lié aux filaments cytoplasmiques d'actine.

Un article présentant la structure cristallographique du complexe entre domaine KASH des nesprines et domaine SUN des protéines SUN est paru lors de ma thèse¹⁰. C'est la première structure tridimensionnelle connue d'un complexe entre deux protéines de l'enveloppe nucléaire. Les auteurs ont montré que le domaine KASH des nesprines 1/2 interagit directement avec le domaine SUN de SUN2 sous forme trimérique.

Les auteurs ont d'abord caractérisé les régions sur chaque protéine, nécessaires et suffisantes pour l'interaction. Pour ce faire ils ont utilisé différentes constructions (Figure 16) et réalisé des Pulldowns sur les protéines recombinantes. Ils en ont conclu que les domaines nécessaires et suffisants pour l'interaction étaient les 29 derniers acides aminés du domaine KASH des nesprines 1 (résidus 8769-8797) et 2 (résidus 6857-6885), qu'ils nomment le peptide KASH, et la région 507-717 de SUN2 comprenant une partie de la région en superhélice (507-540) et le domaine SUN en C-terminal (540-717).

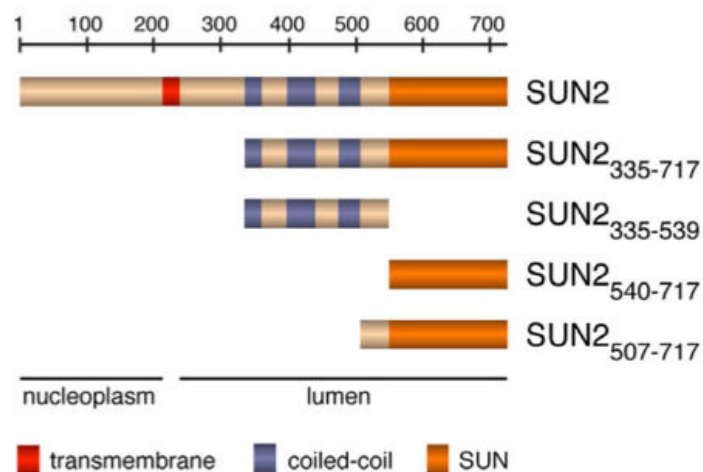


Figure 16 : Constructions de SUN2 testées en Pulldown contre les peptides KASH ¹⁰

Comme la région 507-540 ne fait pas partie du domaine globulaire conservé SUN, les auteurs ont émis l'hypothèse que la contribution de cette région à l'interaction pouvait être attribuée à son rôle dans l'organisation des protéines SUN en oligomères. L'analyse de l'oligomérisation du fragment 507-717 de SUN2 par ultracentrifugation analytique a suggéré la présence de trimères. Les auteurs ont donc ajouté à plusieurs fragments de SUN2 une étiquette GCN4 (région superhélice du facteur de transcription de levure Gcn4 formant spontanément des trimères et forçant donc la construction attachée à trimériser). En présence de cette étiquette GCN4 (donc sous forme de trimère), la région de SUN2 nécessaire et suffisante pour l'interaction avec les nesprines est 521-717.

Après avoir mis les deux partenaires en contact et après avoir clivé l'étiquette GCN4, ils ont obtenu les structures cristallographiques du trimère de SUN2 522-717 seul (apo-SUN2) ou en complexe avec les peptides KASH de la nesprine 1 (8769-8797) ou de la nesprine 2 (6857-6885).

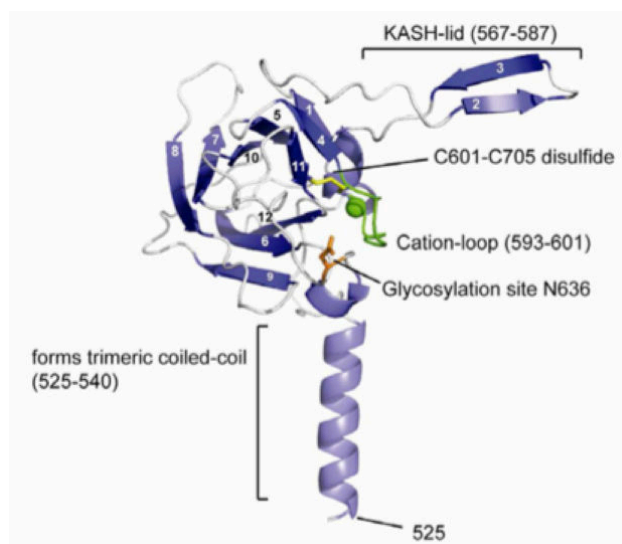


Figure 17 : Structure d'un protomère de SUN2 522-717 ¹⁰

Dans la structure du trimère de SUN2 en complexe avec trois peptides KASH, chaque protomère présente un domaine SUN replié en sandwich β compact (Figure 17). Au niveau N-terminal, une extension en hélice α (résidus 525-540) est impliquée dans la formation de la superhélice (trimeric coiled-coil). Les résidus 567 à 587 constituent une autre extension repliée en feuillet β antiparallèle qu'ils nomment le couvercle KASH (KASH-lid). Enfin, les résidus 593-601 forment une boucle bien définie qui entoure et localise un cation (Cation-loop). Dans la structure cristallographique le cation est certainement un ion potassium mais dans l'environnement ionique de l'espace périnucléaire, c'est probablement un ion calcium. La position de cette boucle est maintenue par un pont disulfure entre les cystéines 601 et 705 (C601-C705 disulfide). La glycosylation de N636 a été observée précédemment et il avait été proposé que cette modification post-traductionnelle n'ait pas d'impact sur l'interaction de SUN2 avec les nesprines ⁴⁸. En effet, cette glycosylation se trouve sur la surface de SUN2 qui n'est pas en contact avec les peptides KASH.

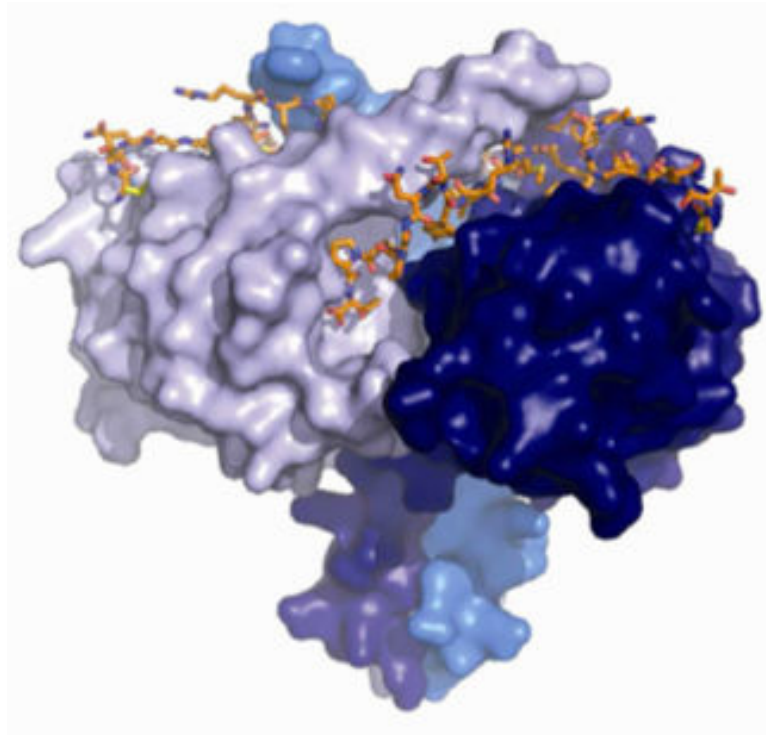


Figure 18 : Structure trimérique du complexe SUN2 / KASH2 ¹⁰

Les constructions de SUN2 sont représentées en différentes nuances de bleu et les 3 peptides KASH de la nesprine 2 sont représentés en bâtonnets orange.

Chaque domaine SUN interagit avec les deux autres domaines SUN via 2 surfaces d'interaction distinctes. Les peptides KASH de la nesprine 2 lient alors ce complexe trimérique dans les sillons formés entre deux domaines SUN adjacents. La liaison se passe de la manière suivante : les 4 résidus en C-terminal du peptide KASH2 sont enfouis dans une poche profonde du protomère 1 de SUN2. Les 11 résidus suivants sont pris en étau entre le KASH-lid du protomère 1 et le cœur du sandwich β du protomère 2. Les 8 derniers résidus interagissent uniquement avec le protomère 2. Le dernier résidu de KASH2 impliqué dans l'interaction est la cystéine C6862 qui va former un pont disulfure avec la cystéine C563 du protomère 2. Suite à ce mode d'interaction un peu particulier, les auteurs ont regardé la conservation des résidus de SUN2 et montré que les résidus impliqués dans la trimérisation de SUN2 ainsi que ceux impliqués dans l'interaction avec les peptides KASH étaient conservés, soutenant leur hypothèse d'interaction.

La fonction majeure du complexe LINC est de fournir un couplage mécanique entre le cytosquelette et le nucléosquelette, permettant la transmission de forces au travers de l'enveloppe nucléaire. Ce complexe trimérique et renforcé par des ponts disulfures semble tout à fait correspondre à un dispositif résistant à l'application d'une force.

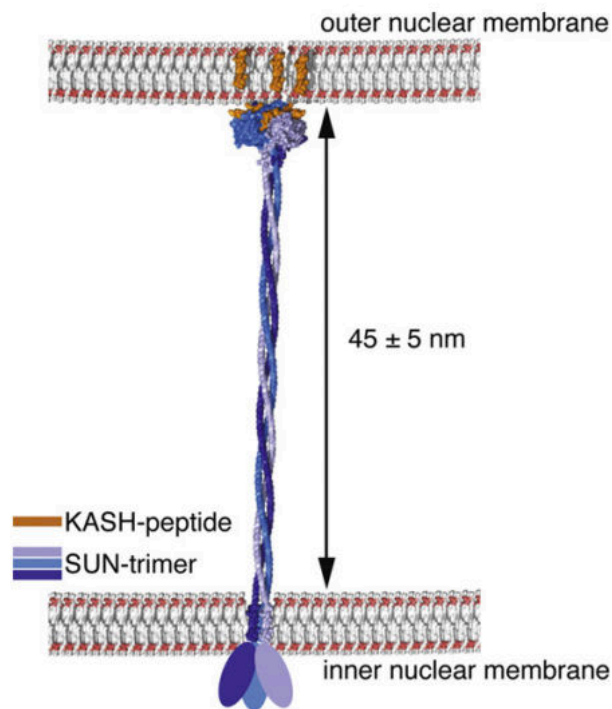


Figure 19: Modèle du complexe LINC ¹⁰

Le complexe LINC est représenté à échelle dans l'espace périnucléaire entre l'INM et l'ONM. Le trimère de SUN2 est modélisé à l'aide de la structure cristallographique expérimentale présentée dans le même article, avec une extension N-terminale en tresse d'hélices, trimérique et calculée de façon théorique.

Par ailleurs, la région périnucléaire en superhélice très rigide des protéines SUN pourrait être responsable de l'espacement régulier entre INM et ONM (Figure 19). En effet l'absence de protéines SUN conduit à des cellules ayant des espaces périnucléaires très irréguliers et parfois très importants ⁴⁹.

Les complexes LINC sont connectés au nucléosquelette de lamines grâce aux interactions entre les protéines SUN 1/2 et la lamine A mais également l'émerine.

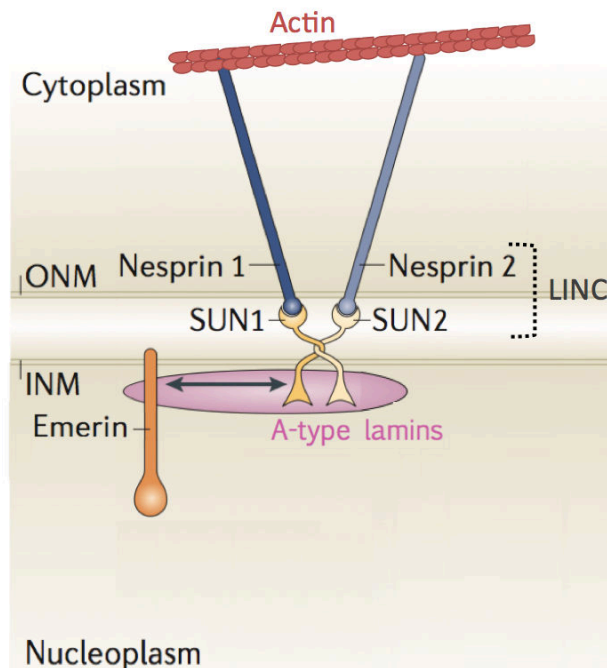


Figure 20 : Interactions entre le complexe LINC et les protéines de l'INM. Adapté de ⁴⁷

Schéma représentant l'enveloppe nucléaire le complexe LINC (Nesprine 1/2 – SUN 1/2) lié aux filaments cytoplasmiques d'actine et aux protéines de l'INM : la lamine A et l'émerine.

Des GST-pulldowns sur des protéines marquées ³⁵S, transcrites et traduites *in vitro* par un système TNT T7, ont permis de déterminer les régions de ces protéines nécessaires aux interactions ⁵⁰. La lamine A interagit avec la région 1-138 de SUN1 et avec la région 1-129 de SUN2 (Figure 21).

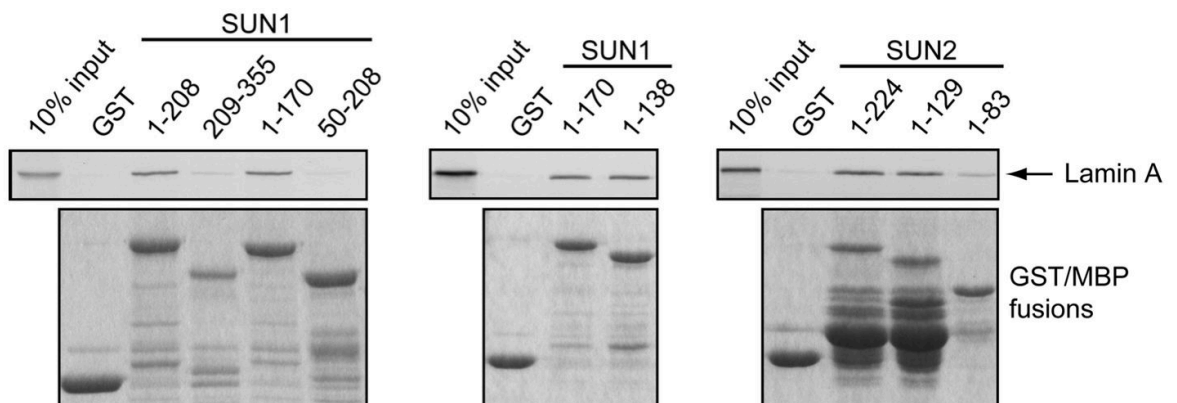


Figure 21 : Pulldowns SUN 1/2 – lamine A ⁵⁰

Les différentes constructions de SUN1 et SUN2 en fusion avec des étiquettes GST ou MBP ont été utilisées pour réaliser des pulldowns de la lamine A ³⁵S traduite *in vitro*.

Après avoir testé de nombreuses mutations pathogènes de la lamine A, les auteurs ont montré que les mutations R527P, L530P, T623S et la délétion des résidus 606 à 655 (progérine) empêchaient l'interaction avec SUN1/2. Les deux résidus R527 et L530 ont été proposés comme importants pour le maintien et la stabilisation de la structure de l'IgFold des lamines et sont localisés sur le brin $\beta 8$, suggérant que les protéines SUN ont besoin que ce brin $\beta 8$ de l'IgFold soit correctement replié pour pouvoir interagir avec la lamine A. Les deux autres mutations (T623S et la délétion 606-655) suggèrent que la partie désordonnée de la queue des lamines A (550-664) est également impliquée dans l'interaction avec les protéines SUN.

L'émerine 1-221 interagit avec la région 223-302 de SUN1 (Figure 22). Les auteurs n'ont pas pu observer d'interaction directe entre l'émerine 1-221 et SUN2 et suggèrent donc un autre mode d'interaction.

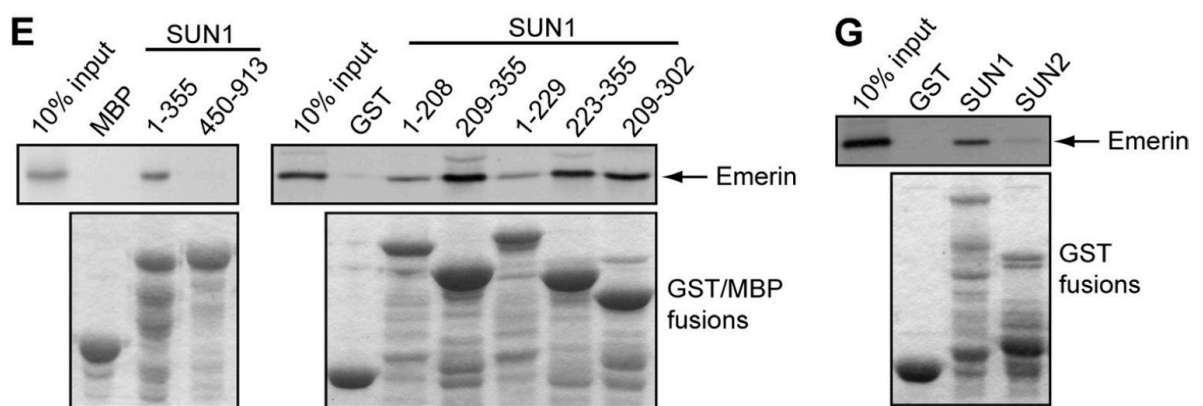


Figure 22 : Pulldowns SUN 1/2 – émerine ⁵⁰

Les différentes constructions de SUN1 et SUN2 en fusion avec des étiquettes GST ou MBP ont été utilisées pour réaliser des pulldowns de l'émerine ³⁵S traduite *in vitro*.

Ils ont également testé différents mutants de l'émerine causant des envelopathies : S54F, Q133H, P183H, P183T, Del95-99, 1-169(208) et Del 236-241. Le seul mutant montrant une diminution de l'interaction avec SUN1 étant le mutant 1-169(208). Ce mutant correspond à un décalage du cadre de lecture à partir du résidu 170 aboutissant à une protéine de 208 résidus, comportant toujours un domaine membranaire mais dont seulement les 169 premiers résidus correspondent à l'émerine. La région C-terminale de l'émerine (170-254) semble donc être nécessaire à l'interaction avec SUN1.

I.3.3. Les protéines LEM

Les protéines LEM sont un groupe de protéines de l'INM qui ont en commun un domaine globulaire LEM (LAP2, Emerin et MAN1) de 40 acides aminés environ. Dans ce groupe, on retrouve l'émerine, MAN1, LEM2, LEM3, plusieurs isoformes de LAP2 et d'autres protéines peu caractérisées à ce jour (Lem3, Lem4 et Lem5). J'ai inséré dans les pages suivantes de cette thèse (p.34 à p.53), la version acceptée d'une revue sur les protéines LEM écrite pour *Methods In Enzymology* et à laquelle j'ai contribué.

Purification and structural analysis of LEM-domain proteins

Isaline Herrada^{*}, Benjamin Bourgeois^{*2}, Camille Samson^{*}, Brigitte Buendia[†], Howard J Worman[‡] & Sophie Zinn-Justin^{*,1}

^{*} Institute for Integrative Biology of the Cell, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Batiment 144 – CEA SACLAY, Gif-sur-Yvette, F-91191, France

[†] Institut de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot-Paris 7, CNRS, UMR8251, 4 rue M.A. Lagroua Weill Halle, 75205 Paris cedex 13, France

[‡] Department of Medicine and Department of Pathology and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, 630 West 168th Street, New York, NY 10032

¹ Corresponding author e-mail: sophie.zinn@cea.fr

² Present address: Center for Integrated Protein Science Munich, Department Chemie, Technische Universität München, 85478 Garching, Germany

Contents

1. Introduction
 2. “Divide and conquer” approach to study LEM-domain proteins
 - 2.1. The LEM domain common to LAP2, emerin and MAN1
 - 2.2. The C-terminal domain specific to LAP2 α
 - 2.3. The WH and UHM domains in MAN1
 3. Analysis of predicted unstructured regions in LEM-domain proteins
 - 3.1. Production and purification of predicted unstructured regions of emerin and MAN1
 - 3.2. Association between globular and predicted unstructured regions of MAN1
 - 3.3. Self-association of emerin via predicted unstructured region
 4. LEM-domain proteins and their partners
 - 4.1. 3D structure of the LEM-BAF complex
 - 4.2. Interaction of the MAN1 WH domain with DNA
 - 4.3. MAN1 interactions with SMAD2/3 and PPM1A
 5. Concluding remarks
- Acknowledgments
- References

Abstract

LAP2-emerin-MAN1 (LEM)-domain proteins are modular proteins characterized by the presence of a conserved motif of about 50 residues. Most LEM domain proteins localize at the inner nuclear membrane, but some are also found in the endoplasmic reticulum or nuclear interior. Their architecture has been analyzed by predicting the limits of their globular domains, determining the 3D structure of these domains and in a few cases calculating the 3D structure of specific domains bound to biological targets. The LEM domain adopts an α -helical fold also found in SAP and HeH domains of prokaryotes and unicellular eukaryotes. The LEM domain binds to BAF (barrier-to-autointegration factor; *BANFI*), which interacts with DNA and tethers chromatin to the nuclear envelope. LAP2 isoforms also share an N-terminal LEM-like domain, which binds DNA. The structure and function of other globular domains that distinguish LEM domain proteins from each other have been characterized, including the C-terminal dimerization domain of LAP2a and C-terminal WH and UHM domains of MAN1. LEM domain proteins also have large intrinsically disordered regions that are involved in intra- and inter-molecular interactions and are highly regulated by posttranslational modifications *in vivo*.

1. Introduction

The nuclear envelope (NE) forms the boundary of the nuclear compartment in eukaryotic cells. The NE includes two nuclear membranes (inner and outer), nuclear pore complexes and the nuclear lamina. The inner nuclear membrane (INM) has numerous integral membrane proteins and closely contacts nuclear intermediate filament proteins, lamins, to form ‘nuclear lamina’ networks that line the membrane. It is poorly understood how these proteins are organized at the structural level: the nuclear periphery is densely packed with proteins and chromatin, and structural investigation of networks of INM proteins and lamins *in situ* remains challenging⁵¹. Current knowledge of the inner aspect of the NE is therefore based on the identification of direct or indirect interactions between integral INM proteins and their partners including lamins, chromatin and transcriptional regulators.

The most extensively studied INM proteins and functional complexes involve LAP2-emerin-MAN1 (LEM)-domain proteins. This protein family is characterized by a globular LEM domain, initially identified in Lamina-Associated Polypeptide 2 (LAP2), Emerin and MAN1⁵². LEM-domain proteins are often anchored at the INM by binding to lamins. However, INM anchoring is not a feature of all isoforms, and no consensus lamin binding motif has been identified in LEM-domain proteins. For example, the LAP2 gene is alternatively spliced to produce six protein isoforms; LAP2 β , γ , δ and ϵ each have a transmembrane domain, whereas LAP2 α and LAP2 ξ do not⁵³. However the LAP2 α isoform-specific region from amino acid 616 to amino acid 693 binds the tail domain of A-type lamins⁵³. LAP2 α is essential for solubilizing a small fraction of lamin A in the nucleoplasm⁵⁴. Yeast two-hybrid experiments showed that LAP2 β , the largest INM-localized isoform, uses residues 298 to 373 to interact with lamins B1 and B2⁵⁴. This lamin-binding region is conserved in most LAP2 isoforms with a transmembrane domain.

The LEM domains of LAP2, emerin and MAN1 directly bind to barrier-to-autointegration factor (BAF)⁵⁵. BAF is highly conserved among multicellular eukaryotes⁵⁶ and is essential in *C. elegans*⁵⁷. BAF co-localizes with chromosomal DNA during both interphase and mitosis in *Drosophila*⁵⁸, but localizes dynamically at the NE, nucleoplasm and cytoplasm in *C. elegans* and mammalian cells⁵⁹. Through mechanisms that are not understood, BAF helps tether chromatin to the nuclear envelope⁶⁰ and functions as an epigenetic regulator⁶¹.

2. “Divide and conquer” approach to study LEM-domain proteins

In mammals, three major types of LEM proteins can be distinguished based on their domain organization as shown in Figure 23⁶². Emerin and LAP2 are INM proteins characterized by one transmembrane segment (Figure 23A). They have an N-terminal nucleoplasmic LEM domain (shown for LAP2 in Figure 23A) and a large region predicted as unstructured, followed by the transmembrane segment and short luminal domain. MAN1 and Lem2 are anchored at the INM by two transmembrane segments, with their N- and C-terminal regions exposed in the nucleoplasm (Figure 23E). Their LEM domains (Figure 23F) are each followed by a large region predicted to be unstructured (like emerin and LAP2 β), and their C-terminal nucleoplasmic regions include either one (Lem2; not shown) or two globular domains (MAN1; shown in Figure 23G,H). Ankle1 and Ankle 2 (also called Lem3 and Lem4) are characterized by ankyrin repeats, which are common protein-protein interaction motifs mainly found in eukaryotes (Figure 23I). Ankle 1 has no transmembrane segment; it is an endonuclease that cleaves DNA and induces a DNA damage response⁶³. Ankle 2 by contrast has an N-terminal transmembrane segment and localizes with the endoplasmic reticulum⁶⁴. Ankle 2 is essential for postmitotic NE formation, and controls BAF phosphorylation by binding and coordinating the activities of kinase VRK-1 and phosphatase PP2A. Structural analysis of LEM domain proteins has been hindered by difficulty expressing and purifying these large modular proteins, especially when they have transmembrane domains. Therefore, a “divide-to-conquer” approach has been chosen by several groups, based on bioinformatics prediction of the limits of the folded regions. Using this approach, globular domains of LEM domain proteins were systematically produced, purified and structurally characterized.

2.1. The LEM domain common to LAP2, emerin and MAN1

Biochemical characterization of the LEM domain started with the chemical synthesis of the LEM domains of human emerin (residues 2 to 54) and LAP2 (residues 103 to 159) and the LEM-like domain of LAP2 (residues 2 to 56) ⁶⁵. The LEM-like domain is a highly divergent version of the LEM domain. Whereas the identity between the LEM domains of emerin and LAP2 is 33%, the LEM and LEM-like domains of LAP2 are only 18% identical. Milligrams of each peptide were produced, purified by HPLC and dissolved in a sodium phosphate buffer (pH 6.3). They were first analyzed by analytic ultracentrifugation, which showed that all these peptides are monomeric at concentrations less than 50 μ M. The three peptides were then analyzed using proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR; 500 and 600 MHz spectrometers), at a concentration of about 1 mM at 25°C, to calculate their three-dimensional structures in solution. Superimposition of the resulting structures revealed that they all adopted the same fold, mainly composed of two large parallel alpha helices stabilized by intramolecular electrostatic interactions and hydrophobic contacts (Figure 24A).

The N-terminal region of LAP2 containing both the LEM-like and LEM domains was also studied by NMR ⁶⁶. A recombinant His₆-tagged LAP2 fragment (residues 1 to 168) was produced in *E. coli* as a ¹⁵N and ¹³C labeled protein. It was purified by affinity and gel filtration chromatography in phosphate buffer pH 7.2. Multidimensional ¹H, ¹⁵N, ¹³C NMR experiments were performed to solve its 3D structure. This fragment contained two structurally independent, non-interacting domains that are connected by a flexible linker and adopt the same α -helical fold. NMR chemical shift mapping demonstrated that the LEM domain binds BAF, whereas the LEM-like domain binds DNA. These interactions involve similar regions of the LEM fold, specifically helix 1, the loop connecting the two large helices and the N-terminus of helix 2. The distinct binding properties of the LEM-like and LEM domains are determined by their surface residues in these locations: predominantly positively charged in the case of the LEM-like domain, and mainly hydrophobic for the LEM domain.

There are few structural domains of less than 50 residues in the Protein Data Bank. A DALI search highlighted that the LEM and LEM-like domains are structurally highly related to the SAF-Acinus-PIAS (SAP) and the Helix-extended loop-Helix (HeH) motifs. For example, the emerin LEM structure can be superimposed onto the SAP structures of human

nuclear protein Hcc-1 and yeast protein Tho1, and the HeH domain of *E. coli* transcriptional terminator protein Rho (Figure 24B). The SAP domain is a eukaryotic putative DNA-binding module found in chromatin-associated proteins that likely targets these proteins to specific chromosomal locations ⁶⁷. HeH domains from bacteria, bacteriophages and plants are known (or predicted) to bind nucleic acids, suggesting that this was the ancestral function of the HeH fold ⁶⁸. The SCOP database gathers all these domains into a category named “LEM/SAP Helix-extended loop-Helix (HeH) motif”. Brachner & Foisner showed in 2011 that orthologs of metazoan LEM-domain proteins in unicellular eukaryotes, which lack BAF, contain a SAP or HeH instead of a LEM motif, suggesting the LEM domain evolved from an ancestral SAP/HeH domain found in chromosome tethering proteins, concomitant with the emergence of BAF ⁶⁹.

2.2. The C-terminal domain specific to LAP2 α

LAP2 α contains an N-terminal region from amino acid 1 to amino acid 186 common to all LAP2 isoforms (including LEM-like and LEM domains, see [Figure 23A,B,C](#)) and a specific C-terminal region from amino acid 187 to amino acid 693 responsible for many of its known functions (see [Figure 23A,D](#)). This last region is specifically involved in LAP2 α retention in postmitotic nuclei and essential for A-type lamin binding ⁷⁰. It is mutated at position 690 (Arg to Cys) in two brothers with dilated cardiomyopathy, but segregation of the disease-causing allele within the family is unclear ⁷¹. LAP2 α variant Arg₆₉₀Cys is reported to be impaired in its ability to bind lamin A. To identify the molecular basis of the LAP2 α / lamin A interaction, full-length murine LAP2 α was digested by chymotrypsin and fragments were analyzed by mass spectrometry and N-terminal sequencing. A stable fragment was identified that comprised residues 459 to 693. This fragment was expressed in *E. coli* and purified by metal affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. Its three-dimensional structure was determined by X-ray crystallography ([Figure 23D](#); ⁷²). The C-terminal region of LAP2 α is an elongated α -helical dimer. Each monomer exhibits six helices with the fourth and fifth arranged into a four-stranded coiled coil. No complex between this C-terminal dimerization domain and A-type lamin tails could be observed using chromatography, calorimetry or ultracentrifugation experiments. Only a solid-phase overlay assay suggested transient binding between the two molecules and pointed to six LAP2 α residues involved in lamin recognition. The Arg₆₉₀Cys substitution was introduced into the murine LAP2 α fragment, but did not impair lamin binding in the solid-phase overlay assay. This illustrates the difficulty encountered in understanding the molecular basis of lamin recognition by LEM-domain proteins.

2.3. The WH and UHM domains in MAN1

MAN1 and LEM2 are LEM-domain proteins anchored in the INM by two transmembrane segments. They exhibit two nucleoplasmic regions: an N-terminal region including the LEM domain and a C-terminal region (see [Figure 23E,F](#)). This last region contains two globular domains in MAN1 ([Figure 23G,H](#)) and one globular domain in Lem2. Both globular domains in the C-terminal region of human MAN1 were analyzed by NMR to determine their three-dimensional structure. A fragment comprising MAN1 C-terminal residues 655-775, which are shared with Lem2, was produced as a ^{15}N , ^{13}C labeled GST fusion protein and purified by affinity chromatography. The GST fragment was cleaved using thrombin and retained on an affinity column. The MAN1 fragment was eluted in the flow-through and then dialyzed to a concentration of about 0.5 mM in phosphate buffer (pH 6.0) containing 150 mM NaCl. It was analyzed by multidimensional ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR, and the 3D structure of the region between residues 666 and 750 was solved from data acquired at 30°C on 600 MHz and 900 MHz spectrometers ⁷³. The N-terminal half of this region is mainly α -helical, whereas the C-terminal half is composed of two large β -strands arranged in a twisted anti-parallel β -sheet ([Figure 23G](#)). The helices form a three-helix bundle. A three-stranded β -sheet is packed onto the three-helix bundle. The α/β interface is mainly hydrophobic. The DALI server clearly identified the MAN1 region from residue 666 to residue 750 as adopting a Winged Helix (WH) fold also found in several DNA binding domains belonging to transcription factors. The helix that contacts DNA in these transcription factors is positively charged in MAN1 and, consistently, the MAN1 fragment binds DNA ⁷⁴. The MAN1 fragment from amino acid 775 to amino acid 911 is not found in Lem2. A point mutation in this region abolishes the capacity of MAN1 to bind R-Smads and repress transcription of the R-Smad-mediated signaling pathway ⁷⁵. Consistently Lem2 is not capable of antagonizing R-Smad-mediated signaling activity ⁶⁹. The MAN1 fragment (residues 755 to 911) was produced as a ^{15}N , ^{13}C labelled His₆-tagged protein to characterize its 3D structure by NMR ⁷⁰. It was purified by affinity chromatography and gel filtration in a Tris buffer (pH 6.7) containing 150 mM NaCl. NMR analysis provided the secondary structure of the MAN1 fragment. However, conformational exchange precluded the determination of its 3D structure. Sequence alignment strongly suggested that residues 785 to 880 adopt a U2AF-Homology Motif (UHM) fold ⁷⁶. NMR chemical shift data were consistent with this prediction. From NMR and bioinformatics analyses, it was possible to calculate a model for the UHM domain of MAN1 ([Figure 23H](#)). Broad NMR signals suggesting conformational exchange were observed in the linker region between the WH and UHM

domains (residues 755 to 785) as well as around the hydrophobic cavity of the UHM domain. UHM domains interact with peptides exhibiting a UHM Ligand Motif (ULM). This motif consists of a patch of positively charged amino acids followed by a conserved tryptophan residue ⁷⁷. In the MAN1 linker region, the motif Lys/Arg₇₆₃-X-Trp₇₆₅-Gln₇₆₆-X-X-Ala₇₆₉-Phe₇₇₀ is highly conserved through metazoans (this motif is represented by a star in [Figure 23E](#)). When Trp₇₆₅ and Gln₇₆₆ are mutated to alanines, the radius of gyration of the MAN1 fragment significantly increases, as shown by Small Angle X-ray Scattering (SAXS), and the NMR signals of the residues of the UHM hydrophobic cavity are changed. From these data, a model of the MAN1 fragment was proposed in which Trp₇₆₅ anchors the linker onto the UHM domain through a conserved intramolecular interaction. The biological significance of this interaction is currently unknown. However, mutating Trp₇₆₅ and Gln₇₆₆ to alanines significantly weakens the interaction between the MAN1 fragment and the MH2 domain of Smad2.

3. Analysis of predicted unstructured regions in LEM-domain proteins

Large Intrinsically Disordered Regions (IDRs) have been identified in LEM-domain proteins, either between two globular domains or between a globular domain and a transmembrane segment (Figure 23A,E,I). The functional role of these regions is not yet understood. They might contain MoRFs, small (10-70 residues) fragments that undergo a disorder-to-order transition upon binding to their partners. However, no 3D structure of a LEM-domain protein IDR bound to its partner has been solved. They are largely post-translationally modified and phosphorylated in a cell-cycle dependent manner ⁷⁸. Phosphorylation of the emerin IDR is also triggered by the application of mechanical force on the nucleus ⁷⁸. The IDR located between the WH and UHM domains of MAN1 (residues 750 to 785) has been studied while analyzing the three-dimensional structure of the whole C-terminal nucleoplasmic region of MAN1. This IDR binds to MAN1 UHM domain, thus regulating its recognition properties ⁷⁹. Mutation of the IDR sequence Trp₇₆₅-Gln₇₆₆ weakens both the intramolecular IDR-UHM interaction and the intermolecular MAN1-Smad2 interaction (Figure 23E). This suggests that the IDR position onto the UHM is critical for Smad2 recognition. Three residues were identified as phosphorylated in this IDR, namely Ser₇₇₇, Ser₇₈₁ and Thr₇₈₃. Ser₇₇₇ and Thr₇₈₃ are potential targets of Pro-directed kinases such as P38 (mitogen-activated protein kinase); Ser₇₇₇ is also a potential target of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β , predictions: elm.eu.org). These kinases might regulate the intramolecular interaction between MAN1 IDR and UHM regions, and thus the binding properties of MAN1. Other larger IDRs have been described in emerin and MAN1 N-terminal nucleoplasmic regions. Production and purification of these regions should enable a biophysical study of their structural and binding properties, either before or after post-translational modification.

3.1. Production and purification of predicted unstructured regions of emerin and MAN1

3.1.1. Emerin nucleoplasmic region

The emerin nucleoplasmic region contains a LEM domain and a large IDR (Figure 23A). We attempted to produce in *E. coli* and purify by chromatography the whole nucleoplasmic fragment of emerin from amino acid 1 to amino acid 221 and a smaller fragment from amino acid 1 to amino acid 187 (emerin 1-187), but only the latter was soluble in our conditions. We expressed it as a His-tag, followed by a TEV site and the emerin 1-187 sequence. The canal coding for this construct was optimized for *E. coli*, synthesized by Rescript and cloned into a pETM13-LIC vector (pETM13 expression vector modified in our laboratory for LIC cloning system). The emerin 1-187 sequence contains four positions with amino acid substitutions or deletions in patients with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD; positions 54, 95-99, 133 and 183). Studying the structural consequences of these mutations is of particular interest knowing that most cases of X-linked EDMD are caused by mutations leading to loss of emerin expression.

Detailed protocol for emerin 1-187 production and purification:

1. *E. coli* cells are grown at 37°C in LB media (or M9 media for NMR samples). When the OD₆₀₀ is between 1 and 1.5, add 0.5 mM IPTG and induce expression overnight at 20°C.
2. Lyse cells by sonication in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol and 1% Triton X-100).
3. As the protein is produced in inclusion bodies, the pellet is resuspended in Buffer A8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 8 M urea) and centrifuged 20 min at 20,000g at room temperature.
4. Load the supernatant on a Ni-NTA column (GE Healthcare) equilibrated in Buffer A8.
5. Wash the column with Buffer A8 and elute protein using 100% Buffer B8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 M Imidazole, 8 M urea).
6. Fractions containing emerin 1-187 are pooled and dialysed against 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl at room temperature in three steps (one night and twice for two hours), and stored at 4°C.

3.1.2 The N-terminal nucleoplasmic region of MAN1

The MAN1 nucleoplasmic region contains a LEM domain and a large IDR (Figure 23E). We first attempted to produce recombinant MAN1 (amino acid 1 to amino acid 471; MAN1 1-471) in *E. coli* as a 6His-tagged fusion protein, with a TEV site between the tag and the MAN1 sequence. However due to weak expression yield and the production of several truncated MAN1 peptides, we optimized the cDNA sequence for expression in *E. coli* and the synthetic gene (ProteoGenix) was cloned into our pETM13-LIC vector.

Detailed protocol for MAN1 1-471 production and purification:

1. *E. coli* cells are grown at 37°C in LB media (or M9 media for NMR samples) and induced 4 h at 37°C, with 0.5 mM IPTG when the OD₆₀₀ is between 0.8 and 1.
2. Lyse cells by sonication: 30 pulses of 1 sec each (power from 20 to 70%) separated by intervals of 1 sec in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 1% Triton X-100).
3. Incubate cell lysates with benzonase for 20 min at room temperature and centrifuge 20 min at 20 000g.
4. As the protein is soluble, load the supernatant on a Ni-NTA column (GE Healthcare) equilibrated in Buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole).
5. Wash the column with Buffer A, and elute using a 20 min gradient from 0% to 100% Buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 M imidazole).
6. Fractions containing MAN1 1-471 are pooled, concentrated by centrifugation using Vivapsin sample concentrators (GE Healthcare), injected on a gel filtration column (Superdex 200, Hi-load, 120 mL, GE Healthcare) equilibrated in a buffer containing 150 mM NaCl and 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine.
7. Store the purified MAN1 1-471 polypeptide at 4°C.

3.2. Association between globular and predicted unstructured regions in MAN1

In the MAN1 C-terminal nucleoplasmic region, a ULM motif was detected in the linker region that interacts with the UHM domain ⁸⁰. Similarly, within MAN1 residues 1-471 a conserved motif Arg₁₉₀-Arg₁₉₁-Lys₁₉₂-Pro₁₉₃-His₁₉₄-Ser₁₉₅-Trp₁₉₆-Trp₁₉₇-Gly₁₉₈ could play the role of a ULM motif. We therefore tested the entire purified N-terminal nucleoplasmic region of MAN1 for potential binding to the C-terminal nucleoplasmic region using 2D ¹H, ¹⁵N NMR. We prepared two NMR samples: both contained 200 ml ¹⁵N labeled MAN1 1-471 at 100 mM in phosphate buffer (pH 6.7) with 150 mM NaCl; one tube also contained unlabeled MAN1 755-911 at 100 mM. 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectra were acquired on both samples at 20°C on a 600 MHz spectrometer. Superimposition of these two spectra revealed an interaction between the two MAN1 nucleoplasmic regions (unpublished results). Indeed, several MAN1 1-471 NMR signals decreased in intensity upon addition of MAN1 755-911. These signals were assigned to the MAN1 sequence Trp₁₉₆-Trp₁₉₇-Gly₁₉₈ thus revealing that this motif behaves like a new ULM. We suggest that the two MAN1 ULM motifs, Trp₁₉₆-Trp₁₉₇-Gly₁₉₈ and Trp₇₆₅-Gln₇₆₆, can compete with each other for binding to the UHM domain leading to regulation of MAN1-SMAD2/3 complex formation.

3.3. Self-association of emerin via predicted unstructured region

A role for the emerin IDR in promoting self-association events was suggested by two studies. First, yeast 2-hybrid experiments revealed that a fragment comprising emerin residues 1-225 binds to itself, suggesting C-terminally-truncated emerin could form homodimers and/or multimers ⁸¹. Second, *in vitro* GST-pulldown experiments using recombinant emerin residues 1-221, and co-immunoprecipitation of full-length emerin from HEK293T cell extracts, also strongly suggested that emerin could oligomerize both *in vitro* and in cells ⁸². To identify which emerin region was responsible for self-association, N-terminally His-tagged emerin fragment was bound to Ni²⁺-NTA agarose under denaturing conditions and the bead-bound polypeptide was incubated with purified GST-tagged emerin fragments in an appropriate binding buffer. After washing the beads, proteins were eluted using SDS-sample buffer and the binding reactions were resolved on gels. This experiment showed that GST-tagged emerin 170-220 is sufficient to bind emerin 1-221, whereas emerin 1-160 does not bind. Further pull-down assays suggested that emerin 170-220 recognized both fragments 1-132 and 170-220. In HeLa cells co-expressing GFP-tagged and Flag-tagged emerin with different deletions, fragment 170-220 was also essential for emerin-emerin co-immunoprecipitation (Berk et al., 2014). Thus self-association is due to sequences that are predicted to be unstructured within the emerin nucleoplasmic region.

4. LEM-domain proteins with their partners

LEM-domain proteins interact with lamins and with other INM proteins such as SUN1, SUN2, LAP1 and contribute to NE architecture⁸³. These interactions play critical roles in nuclear structure and chromatin organization. However, the difficulty in obtaining pure and functional fragments of LEM-domain proteins in their proper oligomerization and modification states makes it difficult to reconstitute *in vitro* biologically relevant complexes. Thus current knowledge is based on studies that focused on binding between specific functional domains and specific partners.

4.1. 3D structure of the LEM-BAF complex

The first LEM-domain complex successfully studied consisted of the LEM domain of emerin and the small (10 kDa) protein BAF. BAF is a centrosymmetric homodimer that binds DNA and thereby bridges two DNA molecules, thus contributing to DNA compaction⁷⁸. Various studies including NMR spectroscopy, X-ray crystallography and site-directed mutagenesis have shown that BAF is a α -helical protein that recognizes DNA through a pair of helix-hairpin-helix (HhH) motifs⁷⁸. BAF binding to emerin 1-187 can be observed in solution by NMR (unpublished results; [Figure 25A](#)). Clore and colleagues determined the three-dimensional structure of the complex between BAF and the LEM domain of emerin ([Figure 25B](#); ⁷⁶). In this structure, one LEM domain interacts with two BAF monomers, as observed by NMR, light scattering and analytic centrifugation, with a dissociation constant of 0.6 μ M as shown by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). However, further studies suggested that post-translational modifications of emerin's IDR also regulate BAF recognition⁸⁴. Information obtained from the structure of the complex showed that BAF binding sites to the LEM domain and DNA do not overlap. Thus, BAF could bind simultaneously to emerin and DNA. However, additional experiments suggested that, in cells, expression of BAF variant Gly₂₅Glu, with Gly₂₅ being located at the interface between BAF and DNA, affected emerin localization during telophase⁸⁵.

4.2. Interaction of the MAN1 WH domain with DNA

The MAN1 residues 655-775 interact with a 211-base pair linear DNA molecule as observed by electrophoretic mobility shift assay⁸⁶. The apparent affinity of the MAN1 fragment for this DNA molecule is 50 nM. Mutations of positively charged residues of the helix predicted to contact DNA, abolish DNA binding. Thus, the recognition helix of the MAN1 WH domain is involved in the binding of the carboxyl-terminal region of MAN1 to DNA.

4.3. MAN1 interactions with SMAD2/3 and PPM1A

Three groups reported that the MAN1 C-terminal region physically interacts with R-Smad proteins to repress the transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway⁸⁷. Mutations in the gene encoding MAN1 cause sclerosing bone dysplasias, which sometimes have associated skin abnormalities⁸⁷. Fibroblasts from affected individuals are haploinsufficient with respect to MAN1 expression. These perturbations enhanced TGF- β signaling, since downstream genes targeted by this pathway were upregulated⁸⁸.

The MAN1 fragment from amino acid 755 to amino acid 911 recognizes the MH2 domain of Smad2 with micromolar affinity. From biochemical, NMR and SAXS analyses, it was possible to calculate a model of the complex between this MAN1 fragment and the Smad2 MH2 domain⁸⁹. As predicted by this model, experiments *in vitro* showed that MAN1 binds to Smad2 alone, and to the activated Smad2-Smad4 complex. However, in cells, MAN1 does not bind Smad4-containing complexes. Overexpression of MAN1 leads to Smad2 dephosphorylation, thus hindering Smad2 binding to Smad4. *In vitro*, MAN1 binds directly to the phosphatase PPM1A, which catalyzes dephosphorylation of Smad2. These results suggest a mechanism through which the MAN1-specific C-terminal region inhibits TGF- β signaling⁹⁰. They demonstrate that this MAN1 region recognizes different forms of Smad2 (monomers, homo and heterotrimers) and show that MAN1, by recruiting Smad2 to the nuclear envelope, facilitates its dephosphorylation by PPM1A and thus its inactivation.

5. Concluding remarks

LEM-domain proteins are involved in diverse cellular processes including DNA replication and cell cycle control, chromatin organization, nuclear assembly, regulation of gene expression and signaling pathways, as well as retroviral infection ⁹¹. The INM LEM-domain proteins LAP2, emerin and MAN1 have been intensively studied using biophysical and cellular approaches. Their LEM domain directly recognizes the DNA binding protein BAF ⁹². However, these proteins are membrane proteins and their soluble regions are largely predicted as intrinsically disordered. LAP2 α dimerizes through its C-terminal α -helical domain ⁹³. Emerin also self-assembles into poorly characterized oligomers ⁹³. It is thus difficult to identify their functional states *in vitro* and to reconstitute complexes between these proteins and their biological partners. First attempts to stabilize nuclear envelope complexes has recently led to the resolution of the X-ray structure of the KASH-SUN complex, located between the outer and inner nuclear membranes ⁹³. Moreover, development of mass spectrometry and NMR techniques now enables description of post-translational modification events in LEM-domain proteins, and their consequences on protein structure and binding properties. Integrative approaches, including structural characterization of protein subcomplexes based on a panel of biophysical techniques and development of new tools in biochemistry and imaging techniques for identification of protein-protein interfaces might ultimately provide a better view of inner NE architecture.

Acknowledgments

This work was supported by AFM grants 17243 (research grant to SZJ) and 18159 (full PhD fellowship to CS), by FRM grant FDT20140931008 (one year PhD fellowship to IH), and by the French national infrastructure FRISBI program.

Figures

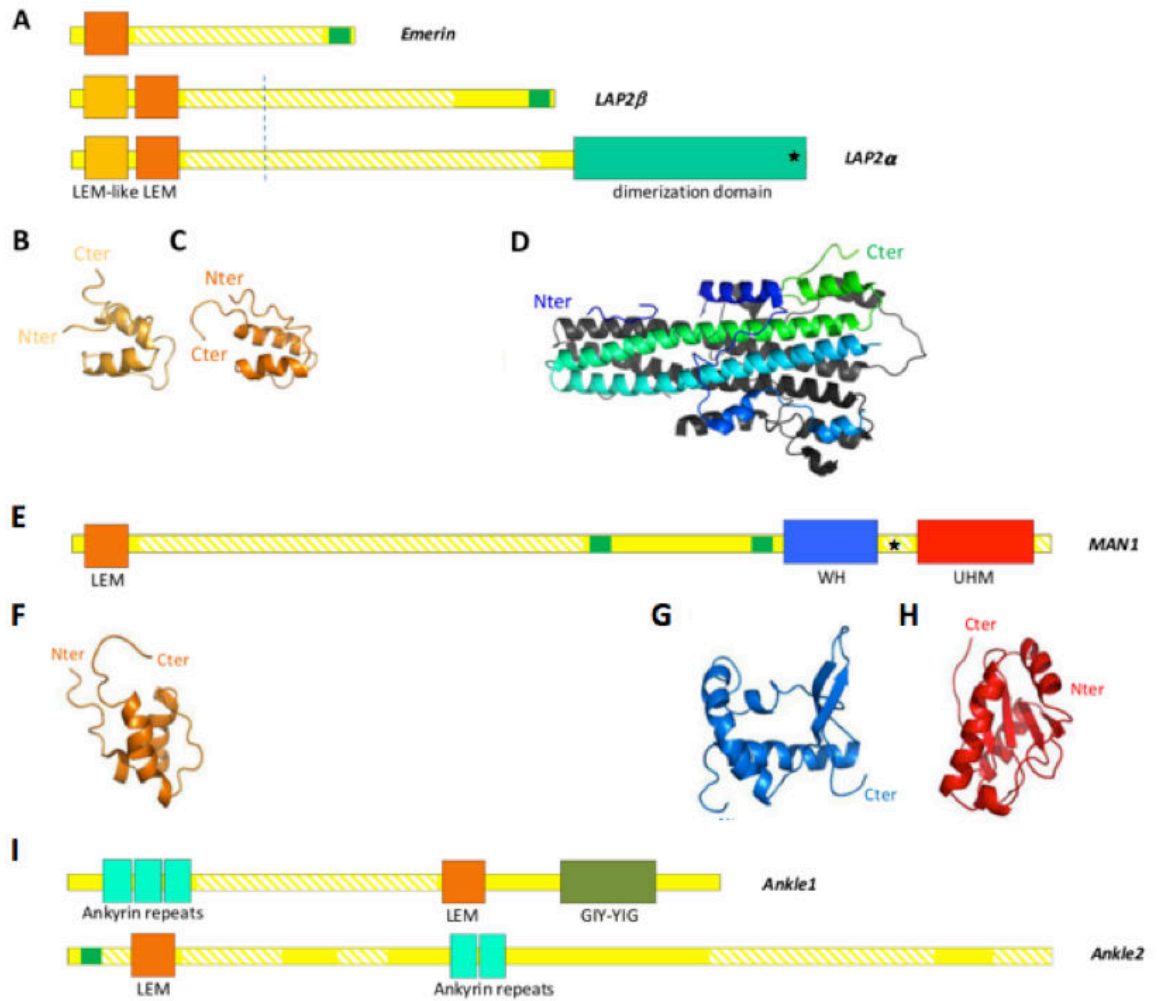


Figure 23 : Schematic of LEM-domain protein architecture

Three families of LEM-domain proteins, illustrated by 6 human proteins. Hatched yellow regions are predicted as intrinsically disordered by Disopred3. Thin green boxes indicate transmembrane domains. Black dotted line indicates that LAP2 isoforms share residues 1-186 but have different C-terminal regions (after the line). **(A)** LEM-domain proteins with one transmembrane domain (emerin, LAP2 β) localize at the INM; alternatively-spliced isoform LAP2 α has no transmembrane domain. The star in LAP2 α indicates the Arg690Cys mutation linked to dilated cardiomyopathy. **(B,C,D)** 3D structures of the LEM-like domain in light orange (PDB code 1H9E), the LEM domain in strong orange (PDB code 1H9F) and LAP2 α -specific dimerization domain in green (PDB code 2V0X). **(E)** INM-localized LEM-domain proteins with two transmembrane segments are Lem2 (not shown) and MAN1. The star in MAN1 indicates the UHM Ligand Motif Lys/Arg₇₆₃-X-Trp₇₆₅-Gln₇₆₆-X-X-Ala₇₆₉-Phe₇₇₀. **(F,G,H)** 3D models of MAN1 globular domains, calculated by homology for the LEM domain in orange, from NMR data for the WH domain in blue (PDB code 2CH0; ⁹⁴) and from NMR chemical shift data and molecular modeling for the UHM domain in red ⁹⁵. **(I)** LEM-domain proteins with ankyrin repeats: Ankle1 is soluble; Ankle2 is ER-localized.

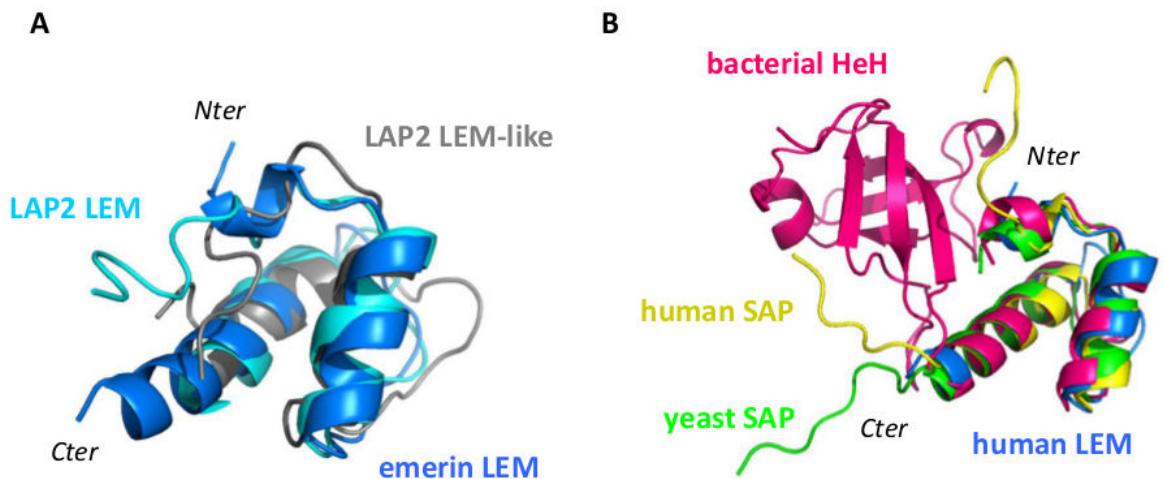


Figure 24 : The LEM domain fold

(A) Superimposition of the LEM structure of emerin (PDB 2ODC in marine blue) with the LEM (PDB 1H9F in cyan; DALI rmsd 2.2 Å) and LEM-like (PDB 1H9E in grey; DALI rmsd 3.0 Å) structures of LAP2. (B) Superimposition of the LEM fold with the bacterial HeH structure from the RNA binding domain of the transcription termination factor rho (PDB 1A62 in magenta; DALI rmsd 1.7 Å), the yeast SAP structure of the RNA binding protein Tho1 (PDB 4UZW; DALI rmsd 1.4 Å) and the human SAP structure of the ribonucleoprotein Hcc-1 (PDB 2DO1; DALI rmsd 2.2 Å).

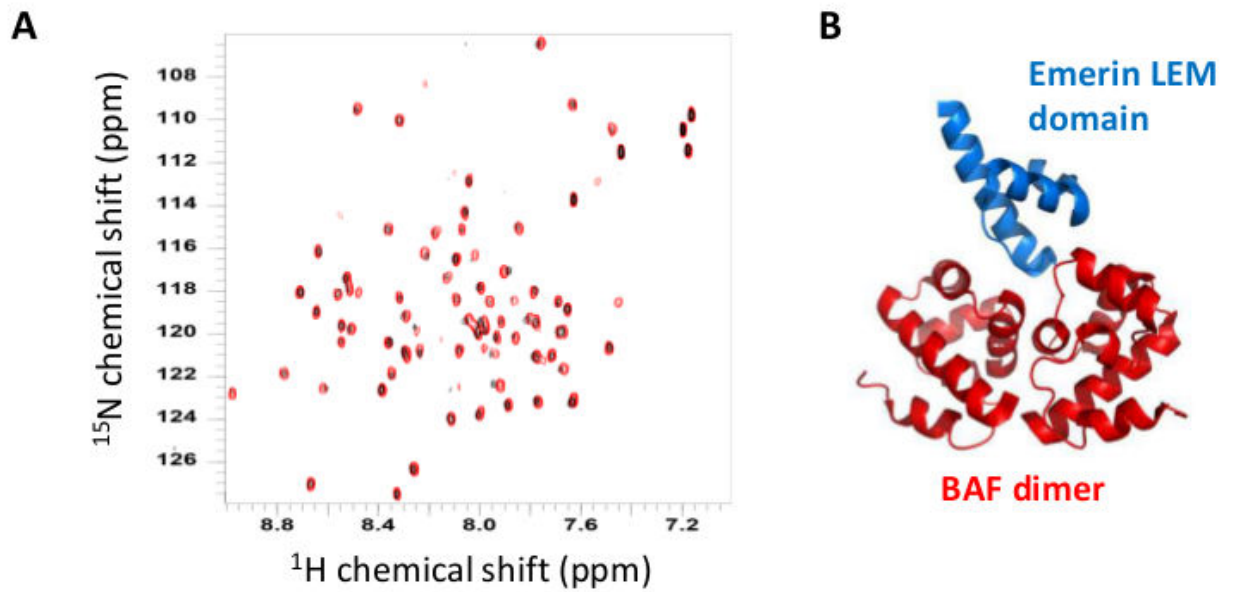


Figure 25 : The emerlin-BAF interaction

(A) Superimposition of two NMR ^1H - ^{15}N HSQC spectra revealing the interaction between emerlin 1-187 and BAF: the red and black spectra were recorded on ^{15}N labelled BAF alone and in complex with emerlin, respectively (in 40 mM phosphate buffer pH 6.7, 150 mM NaCl, 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine, 1 mM EDTA at 20°C on a 600 MHz spectrometer). Disappearance of ^1H - ^{15}N signals indicates binding to the unlabelled partner. **(B)** 3D structure of the LEM-BAF complex: the emerlin LEM-domain is blue, the BAF dimer is red (PDB code 2ODG).

I.3.4. L'actine, autre partenaire nucléoplasmique des protéines de l'INM

L'actine cytoplasmique a été largement étudiée au cours de ces dernières années. Des recherches récentes ont montré la présence d'actine nucléaire dont les fonctions sont plus critiques et controversées (Figure 26). Dans le noyau, l'actine est retrouvée sous deux formes différentes ; sous forme monomérique et sous forme d'agrégats/petits filaments. L'actine sous forme oligomérique semble jouer un rôle dans les processus nucléaires comme la transcription⁵⁵. L'actine nucléaire monomérique en partenariat avec plusieurs protéines Arps (Actin-related proteins) forment des sous-unités de complexes plus importants impliqués dans le remodelage de la chromatine, la transcription des gènes et la réparation de l'ADN.

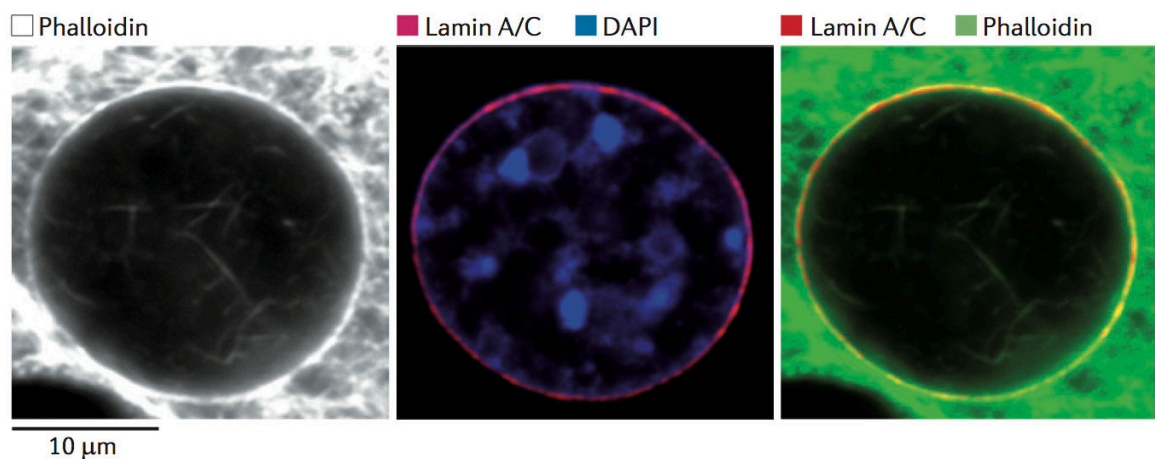


Figure 26 : Visualisation de l'actine nucléaire⁹⁶

Images de microscopie de fluorescence confocale de cellules NIH3T3 avec un marquage à la phalloïdine (en blanc ou vert pour les filaments d'actine), un marquage au DAPI (en bleu pour l'ADN) et un marquage des lamines de type A/C (en rouge).

La découverte récente d'un pool d'actine sumoylée restreint dans le noyau suggère que cette modification post-traductionnelle serait responsable de la rétention de l'actine dans le noyau

⁵⁷.

II. FONCTIONS DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE

L'enveloppe nucléaire, et en particulier le réseau de polymères de lamines et autres protéines associées aux membranes nucléaires, intervient dans de nombreuses fonctions nucléaires essentielles comme (1) l'organisation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes, (2) la régulation des voies de signalisation et la réponse aux dommages de l'ADN, (3) la position, la forme et la taille du noyau ainsi que les propriétés mécaniques de la cellule et bien d'autres ^{60, 97, 98}. Dans les sous-chapitres suivants je décrirai brièvement le rôle des protéines de l'INM dans les 3 fonctions cellulaires citées ci-dessus.

II.1. ORGANISATION DU GÉNOME ET RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES

II.1.1. Régulation de l'expression des gènes

Il devient de plus en plus évident que la localisation d'un gène au sein du noyau affecte la régulation de son expression^{99, 100}. Le repositionnement des clusters de gènes lors du développement et de la différenciation est un moyen de contrôler l'expression des gènes spécifiques de la différenciation. Par exemple, les clusters de gènes spécifiques des testicules sont réprimés dans les cellules somatiques de *Drosophila* par leur ancrage à la périphérie nucléaire médié par les lamines¹⁰¹. Chez *C.elegans*, des gènes rapporteurs contrôlés par des promoteurs myogéniques sont déplacés hors de la périphérie nucléaire lors de la différenciation en cellules musculaires, et leurs promoteurs sont alors activés⁶⁴.

De manière générale, chez les cellules de métazoaires, la périphérie nucléaire a principalement été décrite comme un compartiment de répression de la transcription des gènes (Figure 27). L'euchromatine, riche en gènes transcriptionnellement actifs, est principalement localisée au centre du noyau alors que l'hétérochromatine qui est pauvre en gènes et transcriptionnellement silencieuse est concentrée près de l'enveloppe nucléaire.

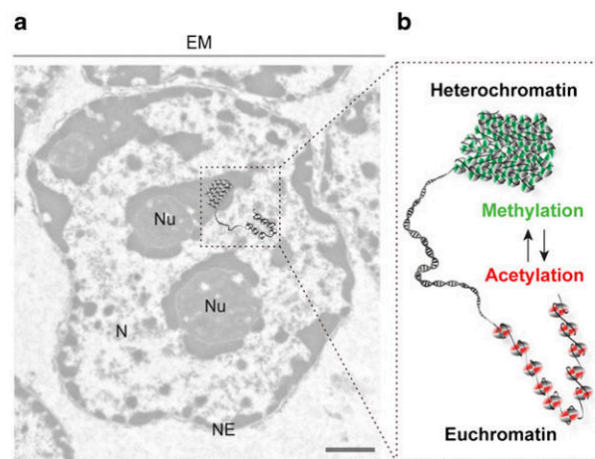


Figure 27 : Organisation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine dans le noyau⁶⁵

A. Image de microscopie électronique à transmission réalisée sur des noyaux de cellules de foie de souris (N = noyau, Nu = nucléole et NE = enveloppe nucléaire). L'hétérochromatine apparaît comme très dense aux électrons (gris) par rapport à l'euchromatine (blanc). **B.** Des modifications spécifiques (méthylations et acétylations) des histones ou de l'ADN ont été attribuées à différents états de condensation de la chromatine.

Il a été suggéré que la membrane nucléaire interne agit comme une surface permettant l'ancrage des régions chromatiniques et régulant ainsi l'expression des gènes. En effet, la déplétion en lamine A est corrélée à des changements dramatiques dans la taille et la forme du noyau mais également à une délocalisation de l'hétérochromatine de la périphérie nucléaire^{67, 102}. Des expériences de microscopie électronique sur des noyaux issus de cellules de myoblastes de souris ont confirmé que la lamina nucléaire est physiquement proche de certaines régions de chromatine relativement compacte tandis que les NPCs colocalisent plutôt avec la chromatine décondensée⁴⁰.

L'enveloppe nucléaire interne participe donc activement à la régulation de l'expression génique. Certains clusters de gènes retrouvés au niveau des LADs (Lamina-Associated Domains), régions proches de la lamina, vont être réprimés tandis que d'autres régions vont être localisées au niveau des NPCs et être transcriptionnellement actives. Leur proximité avec les pores nucléaires facilitera l'export des ARNm naissants.

II.1.1.a. Les acteurs de l'activation de la transcription

Les NPCs

Les gènes en association avec les NPCs sont généralement transcriptionnellement actifs^{70, 71, 103}. Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer cette activation sont très peu connus. L'hypothèse étant que les NPCs constituent un microenvironnement protéique différent de celui situé au niveau de la lamina nucléaire, qui pourrait faciliter le contact entre les régions chromosomiques correspondantes et certains coactivateurs transcriptionnels^{104, 105}.

L'actine nucléaire

L'actine nucléaire a été récemment montrée comme participant activement à la transcription de gènes médiée par l'ARN polymérase II. Elle ferait partie intégrante d'un complexe de pré-initiation de la transcription^{75, 106}.

II.1.1.b. Le « gene-silencing »

Les LADs et LASs

Des expériences de cartographies pangénomiques réalisées chez l'homme et la drosophile ont permis d'identifier un grand nombre de régions du génome (1300 chez l'homme et 500 chez la drosophile) en contact moléculaire avec la lamina nucléaire^{70, 103}. Ces régions, appelées LADs, sont composées de larges segments génomiques (0,1 à 10 Mb) présentant une faible densité de gènes (Figure 28). Ces plusieurs milliers de gènes sont, pour la grande majorité, réprimés⁷⁶.

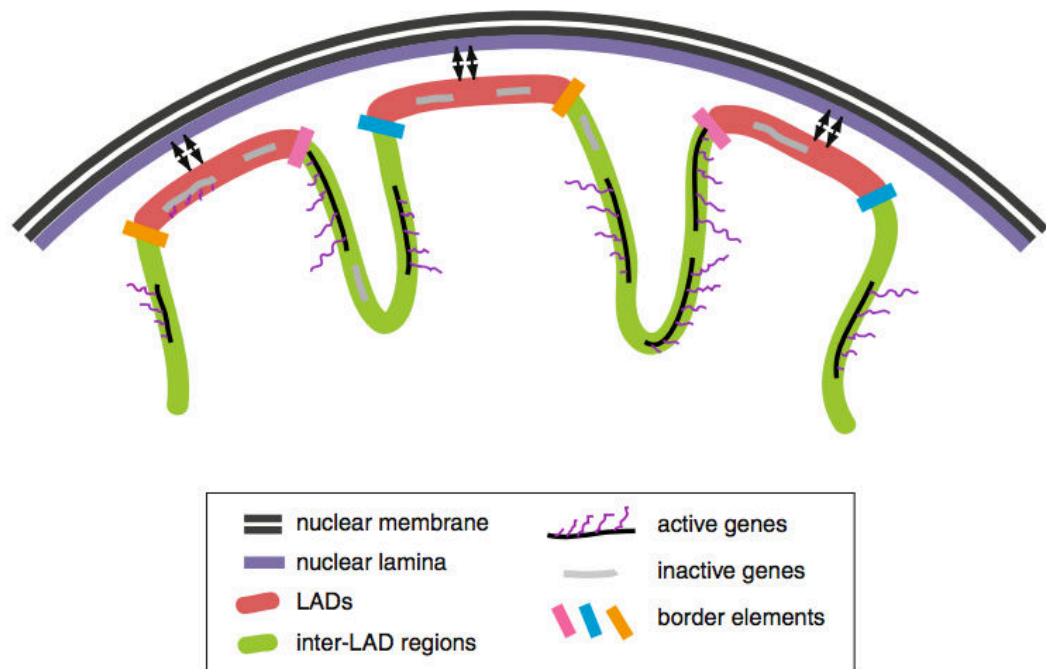


Figure 28 : Organisation du génome humain à proximité de la membrane nucléaire interne⁷⁷

Les LADs (rouge) dont la taille varie entre 0.1 et 10 Mb, interagissent avec la lamina. Les gènes contenus dans ces LADs sont réprimés alors que les gènes des régions inter-LADs (vert) sont transcriptionnellement actifs.

La localisation des LADs à la lamina est possible grâce à la présence de LASs (Lamina-Associated Sequences), régions très enrichies en motif GAGA¹⁰⁷. Il a également été suggéré que la méthyltransférase G9a pouvait promouvoir les interactions LADs/lamina, via la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 (H3K9)¹⁰⁷. La dissociation des LADs de la lamina peut intervenir dans toutes les phases du cycle cellulaire, mais l'association quant à elle, nécessite le passage en mitose pour être effective.

Les protéines LEM servent d'ancrage pour la chromatine à l'INM

Les protéines LEM sont capables de s'associer à la chromatine de façon dynamique par l'intermédiaire de BAF et cette association est probablement régulée par les phosphorylations des protéines LEM, de BAF et par d'autres mécanismes encore inconnus. Une des protéines LEM, LAP2 β , possède à la fois un domaine LEM mais également un domaine LEM-like capable d'interagir directement avec l'ADN double-brin ⁷⁹.

BAF est capable de se lier à HDAC1 (**H**istone **D**e**AC**etyalse 1) ⁸⁰ et les protéines LEM (comme LAP2 β ou l'émerine) sont capables d'interagir avec HDAC3 ^{81, 82}. HDAC1 et dans une moindre mesure HDAC3 vont permettre la déacétylation des histones H4, induisant une répression transcriptionnelle ⁸³.

HDAC3 est également capable d'interagir avec cKrox, un facteur de transcription capable de se lier aux motifs GAGA des LASs, permettant ainsi de stabiliser l'interaction LADs / lamina ¹⁰⁷ (Figure 29).

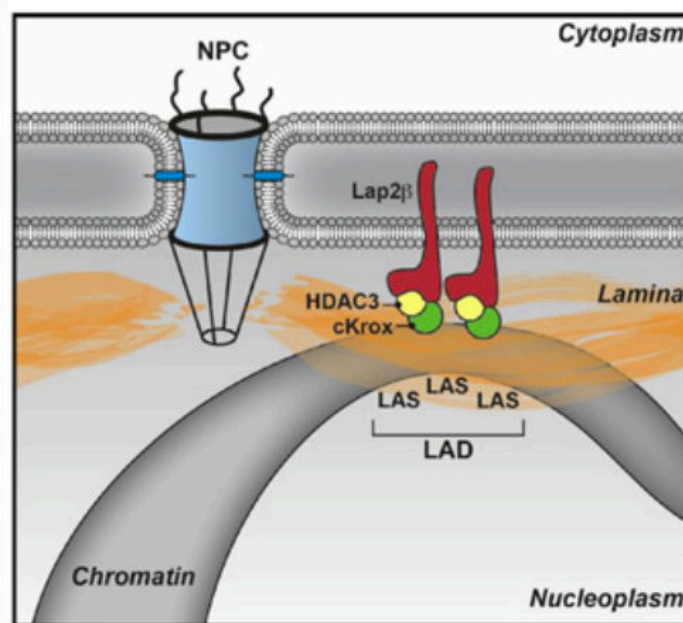


Figure 29 : Modèle de l'interaction des LADs avec la lamina via les protéines LEM ¹⁰⁷

Les motifs GAGA sont reconnus par cKrox qui interagit avec HDAC3 et la protéine LEM Lap2 β . HDAC3 est proposée comme fonctionnant à la fois comme un adaptateur pour l'association à la lamina mais aussi comme un co-répresseur de la transcription via son activité histone déacétylase.

Modifications des histones

Le « gene-silencing » observé au niveau de la lamina, peut également être expliqué par la présence d'un enrichissement partiel en histones modifiées (Figure 30), marqueurs de la répression transcriptionnelle (méthylations H3K9me2 et H3K27me3) et l'absence de marqueurs d'« activation génique » (acétylation de H3K4 et H4K16) ⁷⁶.

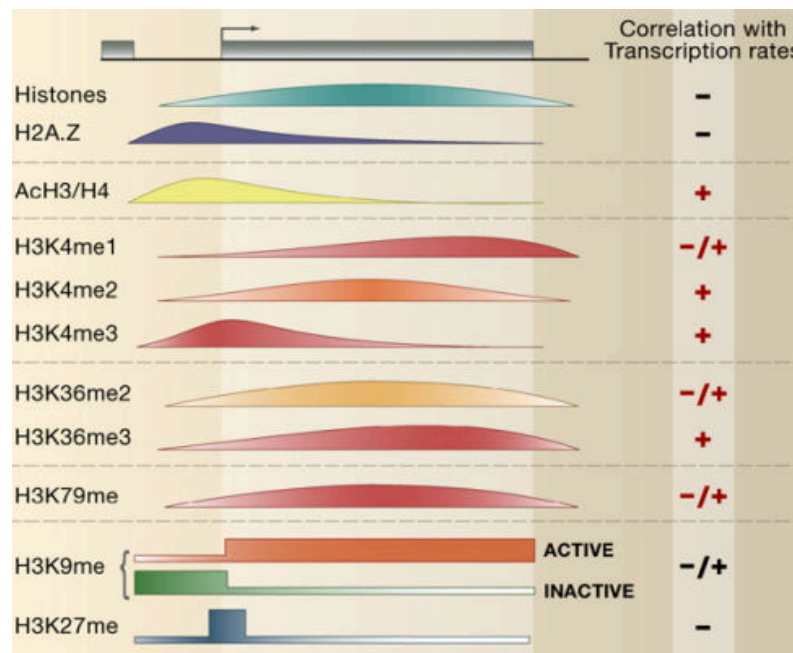


Figure 30 : Modifications des histones et régulation de la transcription ⁸⁴

La distribution des histones et de leurs modifications est cartographiée sur un gène arbitraire. Les courbes représentent les motifs d'expression déterminés par des approches génomiques. Les carrés indiquent que les données sont basées sur très peu d'études. À l'exception des méthylations de H3K9 et H3K27, les autres données ont été obtenues sur des gènes de levure.

La lamine A peut d'interagir avec MOF, une Histone AcetylTransferase (HAT) qui catalyse l'acétylation H4K16 ¹⁰⁸, mais elle est aussi capable de lier et d'activer SirT1 (Sirtuin 1), une HDAC qui favorise la déacétylation de H4K16 ⁸⁶.

SirT1 endogène est trimérique, interagit avec H1 et déacétyle H1K26 ⁸⁷. SirT1 ⁸⁷, l'histone H1 ⁸⁸ et la lamine A ¹⁰⁹ sont toutes trois capables de recruter la méthyltransférase Su(var)3-9 au niveau de la chromatine proche de la lamine A. Il a même été proposé que l'interaction entre la lamine A et la méthyltransférase soit directe. SirT1 va alors déacétyler Su(var)3-9 sur sa lysine 266, ce qui va augmenter le taux de Su(var)3-9 et par conséquent favoriser la méthylation H3K9me3 et donc la répression de la transcription ⁹⁰.

II.1.2. Régulation de la réplication de l'ADN (interaction lamine A - PCNA)

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est un facteur de processivité nécessaire à la phase d'élongation lors de la réplication de l'ADN.

PCNA colocalise avec les lamines A/C en début de phase S ⁹¹ et avec la lamine B1 en fin de phase S ⁹² au niveau des sites de synthèse d'ADN. Il a été montré que PCNA pouvait interagir de façon directe avec le domaine IgFold des lamines et plusieurs modèles moléculaires ont été proposés pour cette interaction (Figure 31) ⁹³.

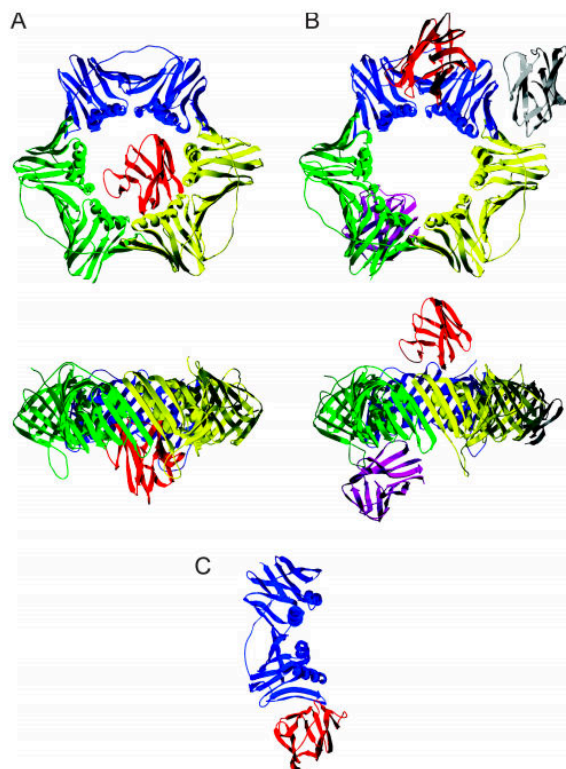


Figure 31 : Modèles de l'interaction IgFold des lamines / PCNA ⁹³

A. Résultats d'une analyse utilisant le logiciel GRAMM-X, représentés sous forme de deux vues orthogonales. Les 10 meilleures solutions placent l'IgFold (rouge) au centre de l'anneau de PCNA (bleu, jaune et vert). Le centre de gravité de l'IgFold est décalé du plan de l'anneau de PCNA de l'autre côté de la face contenant les boucles de connexion inter-domaines. **B.** L'analyse Clus-Pro docking place l'IgFold à trois endroits différents sur l'anneau de PCNA : proche d'une boucle de connexion inter-domaines (rouge), entre deux sous-unités de PCNA (gris) ou sur le côté opposé de la face contenant les boucles de connexion inter-domaines (violet). **C.** Meilleure solution obtenue pour une interaction entre l'IgFold et un monomère de PCNA. L'interaction se produit à l'interface entre les sous-unités de PCNA dans le trimère.

Il a également été montré que la surexpression du domaine IgFold des lamines inhibait la réplication de l'ADN ⁹³. Les lamines sont donc, par un mécanisme dont les détails moléculaires sont encore méconnus, impliquées dans la réplication de l'ADN.

II.2. RÉGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION ET RÉPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN

Les protéines de l'INM ne sont pas seulement impliquées dans l'organisation du génome et la régulation de l'expression des gènes. Les lamines et les autres protéines de l'INM comme l'émerine et MAN1 sont impliquées dans de nombreux processus (1) tout au long de la vie de la cellule comme le développement, la différenciation, la prolifération et l'apoptose, (2) qui contribuent au bon fonctionnement de la cellule comme le maintien de l'intégrité de l'INM ou le métabolisme du cholestérol mais également (3) qui permettent à la cellule de répondre à un stress oxydatif ou à des cassures double-brin de l'ADN.

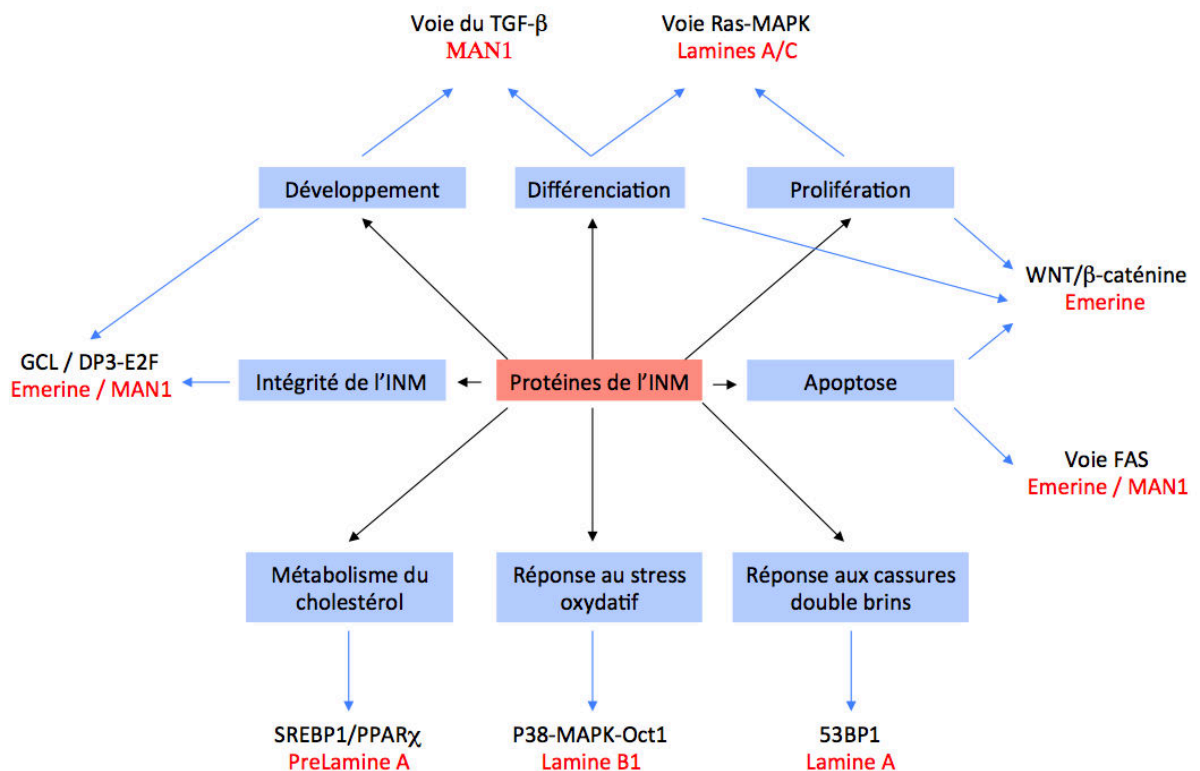


Figure 32 : Réponses cellulaires régulées par les protéines de l'INM

Je ne détaillerai pas toutes ces voies de signalisation dans cette thèse. Je décrirai simplement, à titre d'exemple, le rôle de l'émerine dans la voie WNT / β -caténine et l'implication des lamines dans la réponse au stress oxydatif et dans la réponse aux cassures double-brin.

II.2.1. Prolifération, différenciation et apoptose : rôle de l'émerine dans la voie WNT / β -caténine

La voie de signalisation Wnt contrôle des processus cellulaires divers et variés comme la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose ¹¹⁰. La β -caténine, un des régulateurs de la voie Wnt, est localisée au niveau des jonctions adhérentes, contrôle l'adhésion cellulaire et répond à des voies de signalisation cellulaire. Dans les dernières étapes de cette voie de signalisation, la β -caténine est importée dans le noyau et est impliquée dans la transcription de gènes de réponse. Des données récentes ont montré un rôle majeur de l'émerine dans la régulation de la voie Wnt dans les cellules cardiaques ¹¹¹ (Figure 33). En effet, en s'associant à la β -caténine via son domaine APC-like (Adenomatous Polyposis Coli-like, des résidus 168 à 186), l'émerine inhibe son activité transcriptionnelle, empêche son accumulation dans le noyau et stimule son export nucléaire. Des mutations dans l'émerine causent la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD), maladie aboutissant à une localisation anormale de la β -caténine. La dérégulation de la voie Wnt / β -caténine pourrait être un des mécanismes de l'EDMD.

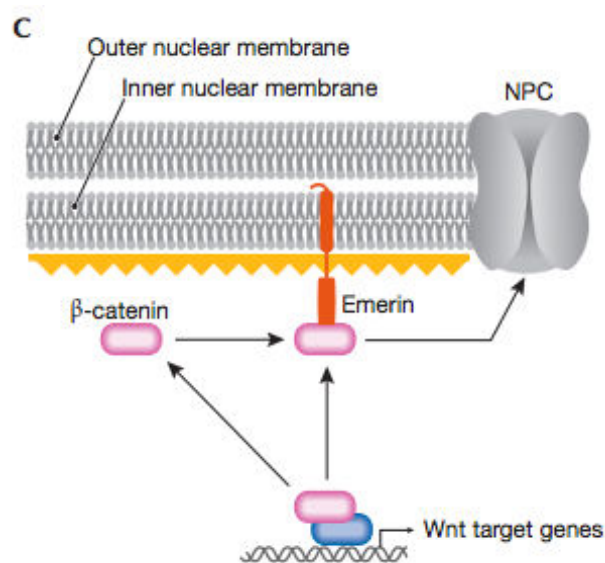


Figure 33 : Modèle de l'inhibition de la voie Wnt / β -caténine par l'émerine ¹¹²

La surexpression de l'émerine empêche l'accumulation nucléaire de la β -caténine et inhibe son activité transcriptionnelle, probablement en facilitant son export nucléaire.

II.2.2. Réponse au stress oxydant : régulation de l'expression de la lamine B1 par la voie p38-MAPK / oct1

Récemment, les lamine B1 ont été montrées comme impliquées dans la prolifération et la longévité des cellules somatiques. En effet, dans des cellules de patients souffrant du syndrome de vieillissement prématuré appelé Ataxie Telangiectasie (A-T), l'augmentation de la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) ainsi que la forme anormale du noyau sont corrélées à une augmentation d'un facteur 3 du niveau d'expression de la lamine B1 ¹¹³.

Cette étude a été réalisée sur des cellules provenant de différents patients, présentant des mutations différentes dans le gène *ATM*. Il semblerait donc que la surexpression de la lamine B1 ne soit pas associée à une mutation spécifique dans le gène *ATM* mais plutôt à une voie de signalisation indépendante d'*ATM*. Dans ces cellules A-T, très sensibles au stress oxydatif, la voie de signalisation p38-MAPK est activée et l'inhibition de la voie p38-MAPK par l'inhibiteur SB203580 permet de retrouver un taux normal de lamine B1 (Figure 34). Même si les mécanismes reliant l'activation de la voie p38-MAPK et l'augmentation du taux d'expression de lamine B1 restent inconnus, il est évident que cette voie de signalisation joue un rôle important dans le phénotype des cellules A-T.

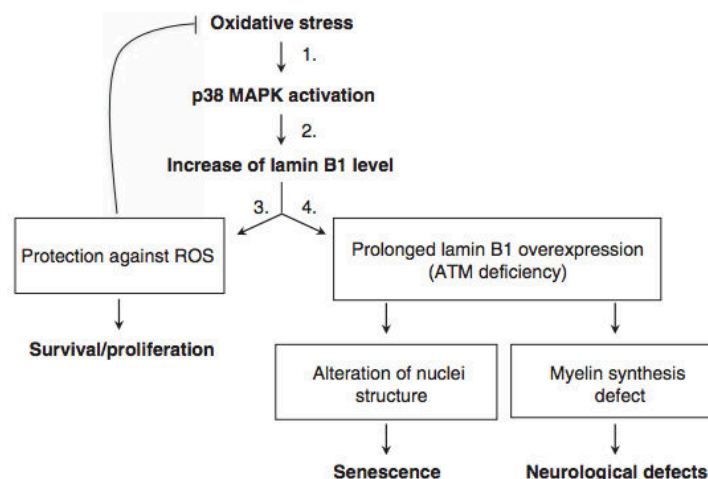


Figure 34 : Modèle de l'implication de la voie p38-MAPK dans l'Ataxie Telangiectasie ¹¹³

Le stress oxydatif conduit à une augmentation du taux de lamine B1 via l'activation de la MAPK p38. La lamine B1 joue un rôle important dans le contrôle du stress oxydant en régulant le taux de ROS et en améliorant la viabilité cellulaire. Dans le cas de stress oxydatif persistant (comme dans les cellules A-T), l'accumulation prolongée de lamine B1 peut aboutir à une sénescence et / ou des défauts neurologiques. En effet, la lamine B1 a un impact sur l'architecture du noyau et la synthèse de la myéline.

II.2.3. Réponse aux cassures double-brin de l'ADN : les lamines de types A régulent la voie de réparation NHEJ

Les deux mécanismes majeurs de la réparation des cassures double-brin (DSBs, Double-Strand Break) sont la recombinaison homologue (HR) et le C-NHEJ (Classic Non Homologous End-Joining). Le C-NHEJ est le mécanisme de réparation prédominant en G0/G1 alors que le HR est responsable des réparations en S/G2. Cependant, il a été montré que la nécessité d'une réparation rapide des dommages de l'ADN fait du NHEJ le mécanisme préférentiel même en S/G2 quand le HR est possible ¹¹⁴.

Dans la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), des mutations dans le gène codant pour la lamine A aboutissent à une forme immature de lamine A appelée progérine. Il a été mis en évidence que les cellules de patients atteints de HGPS accumulaient des DSBs de l'ADN, indiquant un système de réparation de l'ADN déficient, sans pour autant présenter des défauts dans les protéines de la réparation elles-mêmes ¹¹⁵. La seule exception observée est l'accumulation anormale de la protéine XPA au niveau des DSBs, associée au recrutement de facteurs clés comme Rad50, Rad51 et 53BP1 à la cassure ¹¹⁵.

Il a aussi été montré que la perte de lamines de type A induisait une activation des voies de signalisation des dommages de l'ADN, identifiée par la présence de foyers γ H2AX ¹¹⁶. 53BP1 joue un rôle dans la réparation des DSBs en se fixant au niveau de la cassure et en recrutant la machinerie du NHEJ. Les cellules déficientes en lamines présentent des défauts dans l'accumulation de 53BP1, non pas dus à un défaut dans le recrutement de 53BP1 mais à une diminution dans la quantité de 53BP1 disponible. En effet, des défauts dans les lamines entraînent une surexpression de CTSL (cathepsin L), une cystéine protéase de la famille des papaïnes qui va dégrader 53BP1 plus rapidement ¹¹⁶. Cette diminution du taux de 53BP1 pourrait être responsable des défauts dans la réparation de l'ADN observés dans les cellules déficientes en lamines de type A, étant donné que la surexpression de 53BP1 dans les cellules déficientes en lamines de type A restaure un mécanisme de réparation de l'ADN normal.

Un autre article propose une hypothèse différente. Selon les auteurs, les défauts dans les lamines n'affecteraient pas directement la signalisation des dommages mais auraient plutôt un impact sur le redémarrage des fourches de réplication après un arrêt dû à un dommage ¹¹⁷.

II.3. POSITION, FORME ET TAILLE DU NOYAU ET STRESS MÉCANIQUE

II.3.1. La forme et la taille du noyau : l'interaction lamine-émerine-BAF

La lamina est l'un des principaux composants qui déterminent la structure du noyau. En particulier, les lamines de type A, l'émerine et BAF ont été retrouvées dans les mêmes complexes protéiques *in vivo* et jouent un rôle essentiel dans la forme et de la taille du noyau. Les filaments cytoplasmiques aident également à déterminer la forme du noyau ¹¹⁸, soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs interactions avec les complexes LINC qui lient les lamines nucléaires ¹¹⁹.

La diminution de l'expression de l'unique lamine chez *C. elegans* provoque des changements dans la forme du noyau ¹²⁰, comprenant des invaginations de la membrane et la formation de lobulations nucléaires. Ces défauts sont également observés dans les cellules adultes de drosophile dépourvues en lamine DM0 ¹²⁰, dans les cellules de souris dépourvues en lamines de type A ^{121, 122} et dans les cellules humaines porteuses de mutations pathogènes dans la lamine A ^{123, 124}. L'assemblage de noyaux *in vitro*, dans des extraits d'ovocytes de xénope appauvris en lamines, entraîne une fragilisation de ces noyaux ¹²⁵ et la surexpression de la lamine A dans les vésicules germinales de xénope entraîne une augmentation de la rigidité des noyaux ¹²⁶. Des études dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) déplétés en lamines de type A ont montré un défaut dans la forme des noyaux et une diminution de la rigidité de ces noyaux ^{122, 127, 128}. Des changements spectaculaires dans la forme nucléaire ont aussi été observés dans les cellules surexprimant les lamines de type B, et ont été attribués à la prolifération de la membrane provoquée par la présence du groupe farnésyle à l'extrémité C-terminale de ces lamines ^{129, 130}. Cependant, alors que les MEFs dépourvus en lamine B1 montrent une altération de leur forme nucléaire, la rigidité nucléaire n'est pas affectée ¹³¹. Ces derniers résultats suggèrent soit que la lamine B2 remplace la lamine B1 dans cette fonction ou que la rigidité nucléaire est déterminée uniquement par les lamines de type A.

Les cellules dépourvues en émerine montrent des changements dans la forme nucléaire. Chez *C. elegans* l'absence d'émerine provoque des lobulations de la membrane nucléaire et des invaginations ¹³². Des changements similaires dans la forme nucléaire ont été observés en absence de BAF ¹³³.

II.3.2. Protéines nucléaires et propriétés mécaniques du noyau

L'évolution a conduit nos tissus et organes à remplir leur rôle avec une efficacité et viabilité optimale. Les tissus matures en particulier ont besoin d'être résistants aux demandes mécaniques d'une vie active. Nos os, cartilages et muscles squelettiques sont rigides les rendant robustes et résistants aux efforts physiques journaliers, comme la marche ou la course, pendant lesquels ces tissus subissent des chocs, stress et tensions. Les déformations subies au niveau tissulaire sont probablement amplifiées au niveau cellulaire et nucléaire ¹³⁴.

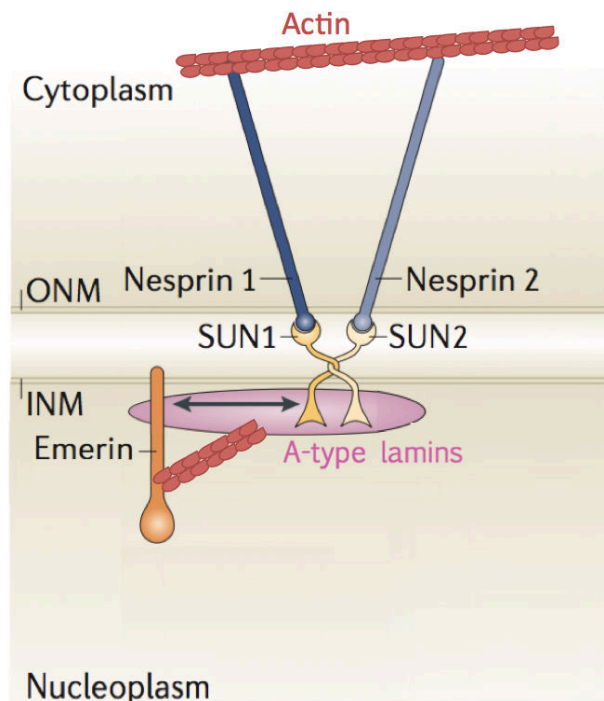


Figure 35 : Protéines de l'enveloppe nucléaire et propriétés mécaniques. Adapté de ⁴⁷

Schéma représentant l'enveloppe nucléaire et les protéines impliquées dans les propriétés mécaniques de la cellule. Adapté de ⁴⁷

Dans ce chapitre je décrirai l'implication du complexe LINC (Nesprines1/2-SUN1/2), des lamines de type A, de l'émerine et de l'actine nucléaire dans les propriétés mécaniques du noyau et de la cellule ainsi que dans la réponse cellulaire à un stress mécanique (Figure 35).

II.3.2.a. Le complexe LINC

Le complexe LINC, formé par une interaction entre les protéines KASH (Nesprines) et les protéines SUN, est capable de transmettre des forces mécaniques au travers de l'enveloppe nucléaire. Cette capacité est adaptée à une large diversité de fonctions comme la définition de la forme et des mouvements du noyau, le maintien de la connexion centrosome-noyau ou encore la transduction de signaux^{135, 136}.

Les protéines KASH ont des extensions cytoplasmiques composées de domaines distincts permettant de lier directement ou indirectement les filaments du cytosquelette comme les microtubules, les filaments d'actine ou encore les filaments intermédiaires¹³⁷.

La liaison entre protéines KASH et microtubules facilite l'association entre le centrosome et le noyau, une des premières fonctions associées au complexe LINC^{138, 139, 140, 141, 142}.

Les nesprines géantes nesprine-1G et nesprine-2G par exemple, sont capables de lier les filaments d'actine via leur domaine CH (Calponin Homology). Ces domaines CH sont suffisants pour le recrutement des filaments d'actine à la surface nucléaire et sont nécessaires pour la position et les mouvements du noyau dépendants de l'actine^{45, 143, 144}. Cependant, ces domaines CH ne sont pas suffisants pour résister à puissance mécanique générée lorsque l'actine induit un mouvement du noyau¹⁴⁵. Lors de la polarisation des fibroblastes précédant la migration cellulaire, le noyau se déplace dans la direction opposée au sens de migration tandis que la position du centrosome reste constante, au niveau du centroïde (centre de gravité)¹⁴⁶. Le centrosome se retrouve alors dirigé vers le sens de migration. La réorientation du centrosome sera alors effectuée grâce aux « TAN Lines » (Transmembrane Actin-associated Nuclear lines), réseaux linéaires formés par les protéines du complexe LINC (nesprines-2G et SUN2) colocalisées avec l'actine fibrillaire cytoplasmique (Figure 36). Ces structures, connectant l'enveloppe nucléaire au cytosquelette d'actine, permettent de générer des forces suffisantes pour réorienter le centrosome en repositionnant correctement le noyau.

Le domaine CH des nesprines est nécessaire à la formation des « TAN lines » et aux mouvements nucléaires mais n'est pas suffisant et nécessite la présence de FHOD1, une protéine permettant de verrouiller l'interaction entre les nesprines et les filaments d'actine¹⁴⁵.

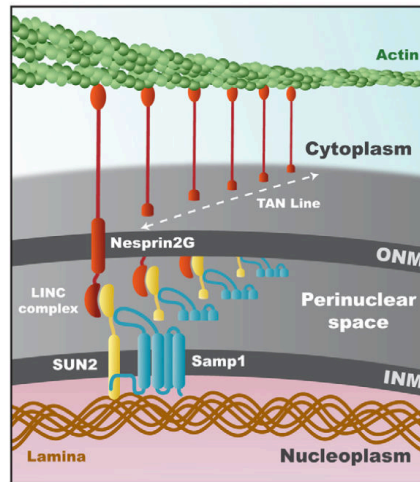


Figure 36 : Enveloppe nucléaire et TAN Lines ¹⁴⁷

Le complexe LINC doit être ancré à l'enveloppe pour faciliter la transmission de forces et permettre la position et les mouvements du noyau. Plusieurs protéines de l'INM vont permettre cet ancrage comme les lamines de type A, l'émerine ou encore Samp1.

Les lamines de type A interagissent directement avec les protéines SUN ⁵⁰. L'absence de lamines de type A augmente la diffusion des protéines SUN dans l'INM ¹⁴⁸ et déstabilise les « TAN lines » ¹⁴⁹.

L'émerine interagit également et directement avec les protéines SUN ⁵⁰. La déplétion d'émerine dans des fibroblastes polarisés induit une migration nucléaire anormale et le glissement des « TAN lines » sur le noyau ¹⁵⁰.

Enfin, la protéine de la membrane nucléaire Samp1 est capable d'interagir avec les protéines SUN mais également avec les lamines de type A ainsi qu'avec l'émerine ^{151, 147}. Samp1 est nécessaire aux mouvements du noyau dépendants de l'actine ¹⁴⁷ dans les fibroblastes et colocalise avec les TAN lines.

II.3.2.b. L'émerine

Il a été montré récemment que la déplétion en émerine augmente la rigidité nucléaire et empêche l'adaptation nucléaire suite à l'application d'une force ¹⁵².

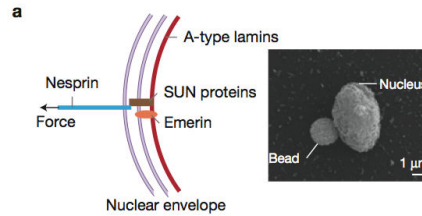


Figure 37 : Système *in vitro* d'application de stress mécanique sur des noyaux isolés ¹⁵²

Gauche. Diagramme du complexe LINC, montrant où les forces de tensions ont été appliquées. **Droite.** Image d'un noyau de cellule HeLa sur lequel est greffée une bille magnétique.

Pour mimer un stress mécanique, les auteurs ont appliqué une force directement sur des noyaux isolés. Ils ont utilisé des pinces magnétiques pour stimuler une bille reliée à la nesprine-1 du LINC (Figure 37). L'application d'impulsions successives avec une force constante aboutit à une augmentation de la résistance du noyau, caractérisée par une diminution du déplacement de la bille. Les auteurs ont montré que l'application d'un stress mécanique sur le noyau induisait la phosphorylation de plusieurs protéines et plus particulièrement la phosphorylation de l'émerine sur deux de ses tyrosines (Y74 et Y95) par la kinase Src (Figure 38, gauche).

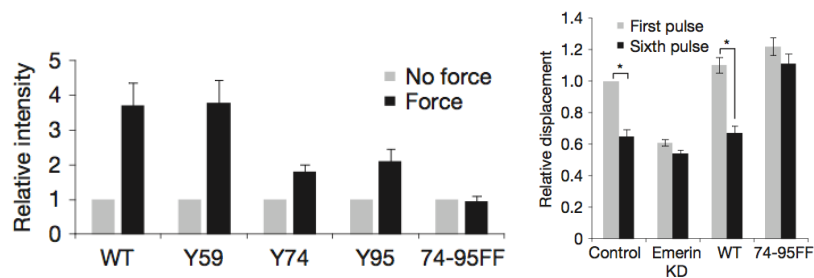


Figure 38 : Rôle des phosphorylations de l'émerine dans la résistance à une force ¹⁵²

Gauche. Phosphorylations de l'émerine WT et des mutants tyrosine (Y74F et Y95F) après application d'une force. **Droite.** Effet du KO (émerine KD) ou de la double mutation Y74-95FF sur l'adaptation du noyau à une force.

Lorsque ces tyrosines sont mutées, le noyau n'est plus capable de s'adapter au stress mécanique et répond de manière similaire quel que soit le nombre d'impulsions successives (Figure 38, droite). L'émerine et notamment sa capacité à être phosphorylée semble jouer un rôle majeur dans la réponse du noyau au stress mécanique.

II.3.2.c. Les lamines

Il a toujours été pensé que le collagène, une des protéines les plus abondantes du corps humain, était responsable de la rigidité des tissus. En effet, les tissus rigides contiennent plus de collagène que les tissus mous.

Cependant, des études récentes^{153, 154} suggèrent également un impact des lamines sur la rigidité des tissus (Figure 39). En effet, la lamina contient majoritairement des lamines de type A dans les tissus rigides tandis que les lamines de type B sont majoritaires dans les tissus mous. Cela pourrait être la fonction principale des lamines et pourrait expliquer que seuls les vertébrés possèdent des lamines de type A.

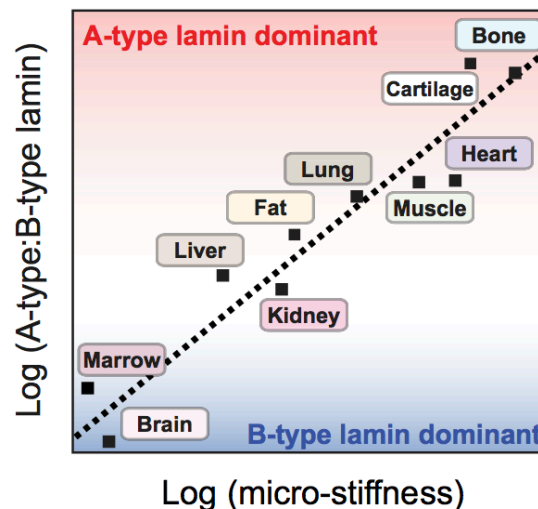


Figure 39 : Relation entre composition en lamines et rigidité des tissus¹⁵⁴

Représentation en échelle logarithmique du ratio lamines de type A / lamines de type B dans les tissus en fonction de leur rigidité.

Le fait que les lamines de type A ne sont pas essentielles à la viabilité cellulaire et qu'elles soient responsables de la rigidité de la cellule est tout à fait cohérent avec leur absence dans les levures et les plantes. En effet, les parois cellulaires rigides de ces organismes protègent efficacement la chromatine et ne nécessitent donc pas la présence de lamine de type A.

Afin de mieux comprendre comment les lamines sont régulées en réponse à un stress mécanique, des cellules souches mésenchymateuses ont été cultivées sur un milieu mimant soit une matrice extracellulaire de cerveau (tissu mou ou « soft substrate ») soit une matrice extracellulaire d'os précalcifié (tissu rigide ou « stiff substrate ») ¹⁵⁴. Dans le cas de tissus mous, l'enveloppe nucléaire est relâchée et fripée alors que dans les tissus rigides le noyau est aplati et l'enveloppe nucléaire est tendue et lisse (Figure 40, haut).

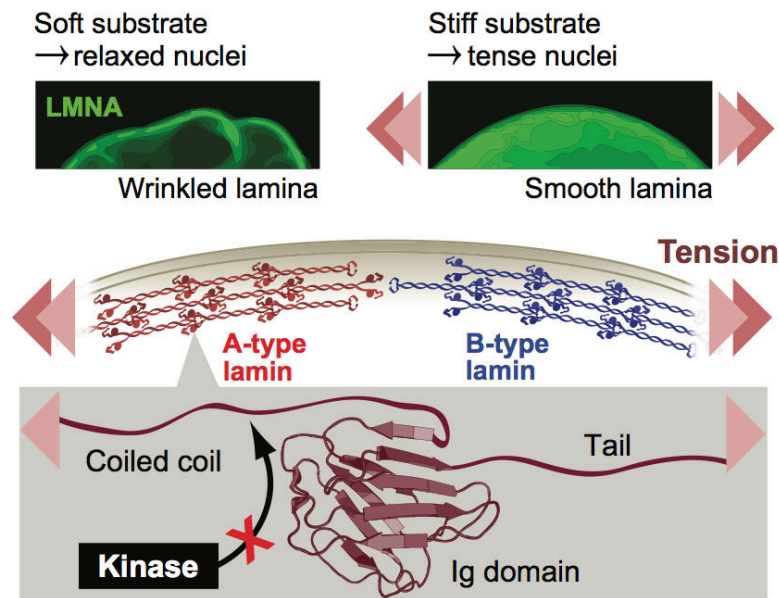


Figure 40 : Régulations des lamines de type A dépendantes de tensions mécaniques ¹⁵⁴

Dans les tissus rigides, les phosphorylations de 4 résidus clés des lamines de type A sont diminuées (Figure 40, bas). Les phosphorylations sont connues pour réguler la solubilité, la conformation et l'organisation des protéines formant des filaments intermédiaires ¹⁵⁵ et en effet, les lamines sont fortement phosphorylées lors de la mitose, permettant le désassemblage de la lamina et de l'enveloppe nucléaire. On pourrait donc imaginer que dans les tissus rigides, la diminution des phosphorylations des lamines de type A induit une diminution de leur solubilité et un raffermissement de la lamina. Dans les tissus mous en revanche, les lamines de type A sont plus largement phosphorylées donc plus solubles, les rendant probablement plus facilement dégradables. Un stress mécanique induit la déphosphorylation des lamines. L'accessibilité d'une cystéine (C522) à un marqueur fluorescent présent dans le tampon a aussi été mesurée lors d'un tel stress. Il a été montré que cette cystéine était plus facilement marquée par le fluorophore. Ce phénomène pourrait être dû à un dépliement partiel de l'IgFold (Figure 40, bas). La réponse à un stress mécanique passerait donc par une déphosphorylation et un dépliement partiel de l'IgFold des lamines.

II.3.2.d. L'actine

Très récemment, des liens physiques et fonctionnels entre le nucléosquelette et le cytosquelette ont été identifiés ¹⁵⁶, et des mutations dans le gène *LMNA* causant des maladies musculaires ont été montrées comme affectant la force du couplage nucléosquelette - cytosquelette ¹⁵⁷. De plus, la polymérisation d'actine est altérée dans les cellules *lmna*^{-/-} et des mutations dans le gène *LMNA*, causant des maladies des muscles striés, bloquent les mouvements nucléaires dépendants de l'actine.

Dans les cellules dépourvues en lamines de type A, le noyau devient plus sensible au stress mécanique ^{122, 127}, l'émerine n'est plus correctement localisée à la membrane nucléaire interne et la polymérisation de l'actine est altérée, provoquant la translocation nucléaire du facteur de transcription mécanosensible MKL1 ¹⁵⁸. L'émerine a été proposée comme pouvant interagir avec l'actine et promouvoir sa polymérisation. Il a également été montré que l'émerine serait capable de coiffer l'actine au niveau de son extrémité (-) pointue ¹⁵⁹.

Dans les MEFs dépourvus en lamines de type A, une translocation nucléaire correcte de MKL1 est rétablie par la réintroduction d'émerine exogène, augmentant ainsi la quantité d'émerine disponible à l'enveloppe nucléaire ¹⁵⁸. Cela indique que l'émerine est un modulateur crucial de la polymérisation de l'actine et que la délocalisation de l'émerine de l'enveloppe nucléaire perturbe la dynamique de l'actine et affaiblit les facultés de signalisation de MKL1.

III. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES DE L'INM

III.1. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES LAMINES

III.1.1. Phosphorylations

L'étude des modifications post-traductionnelles des lamines est devenue primordiale après avoir découvert que des phosphorylations permettaient le désassemblage réversible des lamines lors de la mitose. Des études récentes de protéomique à haut débit ont révélé que les lamines humaines sont très largement phosphorylées, en particulier lors de la mitose^{160, 161, 162, 163, 164}. Cependant, il est important de noter que certains sites mitotiques sont également phosphorylés lors de l'interphase. Avec en tout 61 sites de phosphorylation, les lamines de type A ont deux fois plus de sites identifiés que la lamine B1 (32 sites) ou la lamine B2 (28 sites). De manière générale, les domaines tête et queue contiennent la plupart des sites de phosphorylation, avec la plus grande densité entre le domaine tige et le signal de localisation nucléaire (NLS). Je présente ici quelques exemples de la littérature traitant les phosphorylations des lamines.

III.1.1.a. Conservation des résidus phosphorylés

12 des sites de phosphorylation sont conservés dans les trois lamines humaines et 11 sont situés dans des régions importantes pour la dépolymérisation mitotique des lamines (thréonine 19, 24 et 394 et sérines 22, 390, 392, 395, 398, 403, 404 et 407 dans les lamines de type A). Le douzième site de phosphorylation conservé est la sérine 303 dans les lamines de type A, localisé dans le domaine Coil2.

D'autres sites de phosphorylation supplémentaires sont conservés entre :

- les lamines de type A et la lamine B1 (4 sites : Thr 3, Ser 18, 277 et 652 sur la lamine A).
- les lamines de type A et la lamine B2 (6 sites : Thr 64 et 409, Ser 71, 301, 406, 409 et 458 sur la lamine A).
- la lamine B1 et la lamine B2 (4 sites : Thr 359, et Ser 232, 401 et 406 sur la lamine B1).

Ces conservations des sites de phosphorylation reflètent potentiellement une régulation d'autres fonctions importantes par les phosphorylations^{165, 166, 167, 168, 169}.

III.1.1.b. Phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire

Les phosphorylations des lamines ont lieu tout au long du cycle cellulaire. Une étude de la lamine B2 dans une lignée de cellules DLD (cancer colorectal) a révélé la phosphorylation de cinq résidus au cours du cycle cellulaire ¹⁷⁰ :

- Thréonine 34 et sérine 37 : phosphorylées en cours de prophase et restent phosphorylées jusqu'à la fin de l'anaphase
- Sérine 405 : son niveau de phosphorylation augmente pendant la prophase et est maintenu jusqu'à la fin de la phase G1
- Sérine 407 : phosphorylée seulement pendant la phase G1 et la prophase
- Sérine 421 : phosphorylée pendant la transition-S-G2

De ces sites de phosphorylation de la lamine B2, quatre sont conservés dans les deux autres lamines (lamines de type A et lamine B1) et le cinquième (sérine 421 de la lamine B2) est conservé uniquement dans les lamines de type A.

III.1.1.c. Les phosphorylations des lamines ont majoritairement lieu lors de la mitose

Dans le domaine tête de tous les lamines, la sérine 22 (dans les lamines de type A) est très conservée et phosphorylée par la kinase mitotique dépendante des cyclines CDK1 ¹⁷¹. Les phosphorylations des lamines par CDK1 sur les sérines 22, 392, 404 et 406 ³² empêchent l'assemblage des lamines en polymères tête-à-queue mais n'ont aucune influence sur la formation des dimères ³⁶. Ces 4 phosphorylations vont permettre lors de la mitose de dépolymériser les filaments de lamines ^{172, 173, 174, 175, 176, 177, 178}. La famille des protéines kinases C (PKC) régule également l'assemblage des lamines lors de la mitose ^{173, 179}. Chez le zebrafish par exemple, les lamines sont phosphorylées en premier par PKC ¹⁸⁰, suggérant que les sites de phosphorylation par PKC pourraient masquer les sites de phosphorylation par CDK1 ¹⁸¹. Les PKC phosphorylent également les lamines en dehors de la mitose comme par exemple la phosphorylation de la sérine 525 dans l'IgFold des lamines de type A en interphase ¹⁸². D'autres kinases comme PKA, S6-kinase II et Akt, ciblent les lamines. La sérine 404 des lamines humaines de type A est phosphorylée à la fois par S6-kinase II ¹⁷⁴ mais également par Akt suite à un traitement à l'insuline dans des cellules HEK 293T ¹⁸³. La lamine A est retrouvée mutée sur cette sérine (S404A) ou sur un résidu voisin (R401C) dans l'EDMD et les cellules de ces patients montrent une désorganisation des réseaux de lamines et des lobulations nucléaires ¹⁸³.

III.1.1.d. Phosphorylations des lamines et laminopathies

Parmi près de 400 mutations pathogènes dans la lamine A ¹⁸⁴, seulement quatre d'entre elles correspondent à des sites de phosphorylation connus (thréonines 10 et 505 et sérines 303 et 395). Cependant de nombreux sites de phosphorylation connus sont proches, dans la séquence ou dans l'espace, de mutations pathogènes et pourraient être affectés indirectement. Un autre exemple est la sérine 458 de la lamine A qui a été retrouvée phosphorylée uniquement dans les cellules musculaires de patients atteints d'EDMD et de LGMD. Ces patients présentent des mutations localisées dans le domaine de IgFold mais situées très loin de la sérine phosphorylée ¹⁸⁵. Les mutations pourraient permettre à la lamine de reconnaître et recruter spécifiquement la kinase Akt, qui phosphoryle la sérine 458 de l'IgFold ^{185, 186, 187}.

Les résidus 560 à 649 de la lamine A, qui n'ont pas d'équivalent dans les lamines de type B, sont largement phosphorylés et les onze sites de phosphorylation connus dans cette région sont absents chez les patients souffrant d'HGPS (causant la perte de résidus 608-658).

III.1.2. Autres modifications post-traductionnelles

Les lamines subissent d'autres types de modifications post-traductionnelles comme :

- Une O-GlcNAc glycosylation des sérines 612 et 643 de la lamine A lors de la mitose dont les conséquences fonctionnelles sont encore inconnues ¹⁶⁰.
- Une oxydation des cystéines 522, 588 et 591 de la lamine A conduisant à la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires. La mutation de ces cystéines en alanines force les cellules à entrer en sénescence prématurément en réponse au stress oxydant. Les lamines pourraient donc jouer un rôle important « d'éponge à ROS », protégeant la cellule lors de stress oxydant ^{188, 189}.
- La sumoylation des lysines 201, 420 et 486 de la lamine A dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues ¹⁹⁰.
- L'acétylation des lysines 97, 108, 114, 270, 311 et 378 du domaine tige de la lamine A, de la lysine 417 dans le NLS et de la lysine 450 dans l'IgFold. La fonction de ces acétylations n'est pas connue mais certains suggèrent qu'elles pourraient influencer l'accrochage de la chromatine à la lamina ^{191, 192}.

III.2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE L'ÉMERINE

Dans les cellules eucaryotes, les protéines de l'INM, les NPCs et les lamines se désassemblent en prophase pour permettre la formation du fuseau mitotique et se réassemblent en fin de mitose. De ce fait, la formation de complexes protéiques, dépendante du cycle cellulaire, entre les protéines de l'INM, les lamines et la chromatine est régulée par des modifications post-traductionnelles (PTMs), elles aussi dépendantes du cycle cellulaire. L'émerine fait partie de ces protéines subissant des PTMs dépendantes du cycle (Figure 41).

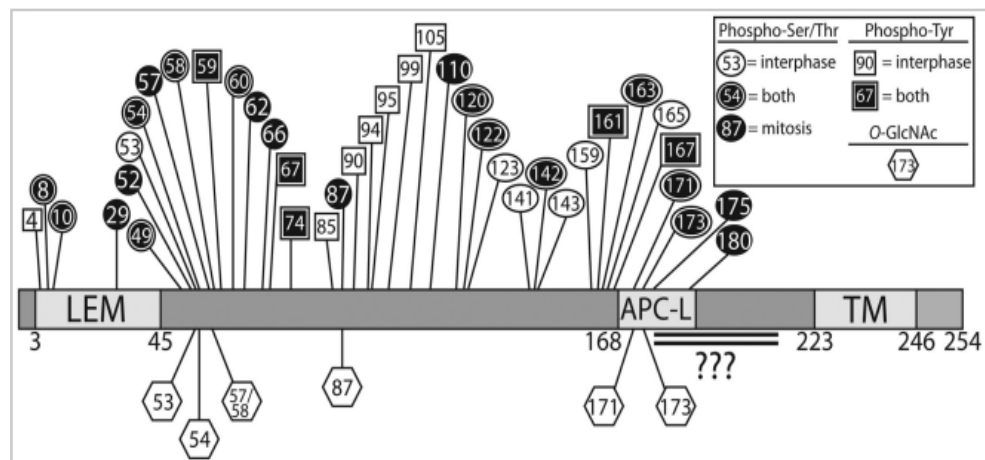


Figure 41 : Diagramme schématisant les sites de PTMs démontrées expérimentalement chez l'émerine ¹⁹³

Les hexagones correspondent à des O-GlcNAcylation, les cercles correspondent à des phosphorylations sur les sérines et thréonines, les carrés correspondent à des phosphorylations sur les tyrosines. Les formes blanches sont des modifications retrouvées en interphase, les noires en mitose et les noires cerclées de blanc dans les deux phases. La région doublement soulignée est une région dont toutes les modifications n'ont pas pu être identifiées par spectrométrie de masse.

L'émerine subit des modifications post-traductionnelles et principalement des phosphorylations sur ses sérines, thréonines et tyrosines. Ces modifications post-traductionnelles sont localisées sur 3 régions (« hotspots » correspondant aux résidus 49-62, 85-105 et 161-173) ce qui suggère une interrégulation des différentes modifications. Certaines kinases ont d'ailleurs été proposées comme pouvant phosphoryler l'émerine : Src, Abl et Her2 ¹⁹⁴ ; PKA ¹⁹⁵ ; ERK2/MAPK ¹⁹⁶ et GSK3β ¹¹¹. L'émerine est également O-GlcNAc glycosylée, une modification post-traductionnelle réversible qui implique l'addition de N-Acetylglucosamine sur des sérines ou thréonines. Il a été proposé que cette glycosylation sur la sérine 173 de l'émerine régule l'interaction émerine-BAF ¹⁹⁷.

IV. LES PROTÉINES DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE DANS LES DIFFÉRENTES PATHOLOGIES

IV.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES ENVELOPATHIES

Des mutations dans le gène *LMNA* codant pour la lamine A ont été montrées comme aboutissant à différentes pathologies regroupées sous le nom de laminopathies.

Ces laminopathies peuvent être classées en 4 groupes :

- Les laminopathies avec atteinte cardiaque et parfois atteinte des muscles squelettiques
 - La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD)
 - La dystrophie musculaire des ceintures (LGMD : Limb-Girdle Muscular Dystrophy)
 - La cardiomyopathie dilatée 1A (DCM1A).
 - La dystrophie musculaire congénitale (CMD)
 - Le syndrome cardiomélisque type slovène (HHS : Heart-Hand syndrome)
- Les laminopathies avec atteinte des tissus adipeux ou lipodystrophies
 - La lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan (FPLD)
 - La dysplasie mandibulo-acrale (MAD)
 - La lipoatrophie (LA)
- Les laminopathies avec atteinte du système nerveux périphérique :
 - La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (CMT-2)
- Les laminopathies avec syndrome de vieillissement prématuré :
 - Le syndrome atypique de Werner (AWS)
 - La dermopathie restrictive (RD)
 - La progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)

Plus récemment des mutations dans les gènes codant pour les autres lamines ou pour d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire associées aux lamines ont été découvertes. Ces mutations conduisent aux mêmes maladies ou du moins à des phénotypes similaires (Figure 42). Le nom de laminopathies s'est alors généralisé en envelopathies.

Striated Muscle Diseases	Gene Mutated
Emery-Dreifuss muscular dystrophy	<i>LMNA</i> , <i>EDMD</i> , <i>SYNE1</i> , <i>SYNE2</i> , <i>TMEM43</i> , <i>TMPO</i>
Limb-girdle muscular dystrophy	<i>LMNA</i>
Dilated cardiomyopathy	<i>LMNA</i> , <i>EDMD</i> , <i>SYNE1</i> , <i>SYNE2</i> , <i>TMEM43</i> , <i>TMPO</i>
Congenital muscular dystrophy	<i>LMNA</i>
Heart-hand syndrome	<i>LMNA</i>
Lipodystrophy	
Dunnigan-type familial partial lipodystrophy	<i>LMNA</i>
Mandibuloacral dysplasia	<i>LMNA</i> , <i>ZMPSTE24</i>
Lipoatrophy	<i>LMNA</i>
Partial Lipodystrophy	<i>LMNB2</i>
Premature Aging	
Atypical Werner Syndrome	<i>LMNA</i>
Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome	<i>LMNA</i>
Restrictive Dermopathy	<i>LMNA</i> , <i>ZMPSTE24</i>
Atypical Progeria Syndrome	<i>BANF1</i>
Peripheral Nerve Disorders	
Charcotte-Marie Tooth Syndrome	<i>LMNA</i>
Adult-onset leukodystrophy	<i>LMNB1</i>
Spinocerebellar ataxia type 8	<i>SYNE1</i>
Bone Diseases	
Buschke-Ollendorff Syndrome	<i>LEMD3</i>
Melorheostosis	<i>LEMD3</i>
Osteopoikilosis	<i>LEMD3</i>
Greenberg skeletal dysplasia	<i>LBR</i>
Other	
Pelger-Huet Anomaly	<i>LBR</i>
Arthrogryposis	<i>SYNE2</i>

Figure 42 : Gènes codant pour les protéines de l'INM et envelopathies associées ¹⁹⁸

Pour chaque envelopathie, les gènes retrouvés mutés sont représentés dans la colonne de droite. *LMNA* pour les lamines de type A, *LMNB1* pour la lamine B1, *LMNB2* pour les lamines B2 et B3, *EDMD* pour l'émerine, *SYNE1* pour la nesprine 1, *SYNE2* pour la nesprine 2, *TMEM43* pour LUMA, *TMPO* pour LAP2 α , *ZMPSTE24* pour Zmpste24, *BANF1* pour BAF, *LEMD3* pour MAN1 et *LBR* pour LBR.

Je ne détaillerai pas ces mutations et les phénotypes associés dans cette thèse. Je décrirai simplement les mutants de l'émerine sur lesquels j'ai travaillé lors de ma thèse et qui aboutissent à une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss liée à l'X.

IV.2. LES MUTANTS DE L'ÉMERINE DANS LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE X-EDMD

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss liée à l'X (X-EDMD) est due à des mutations dans le gène *EMD* codant pour l'émerine. A l'heure actuelle, une centaine de mutations dans ce gène ont été retrouvées chez des patients souffrant d'EDMD liée à l'X¹⁹⁹. 86% de ces mutations aboutissent à une absence totale d'émerine. Pour 5 mutations (S54F, Del95-99, Q133H, P183H, P183T et Del95-99), localisées dans le domaine nucléoplasmique et prédit comme déstructuré de la protéine (Figure 43), l'émerine est présente dans les cellules des patients.

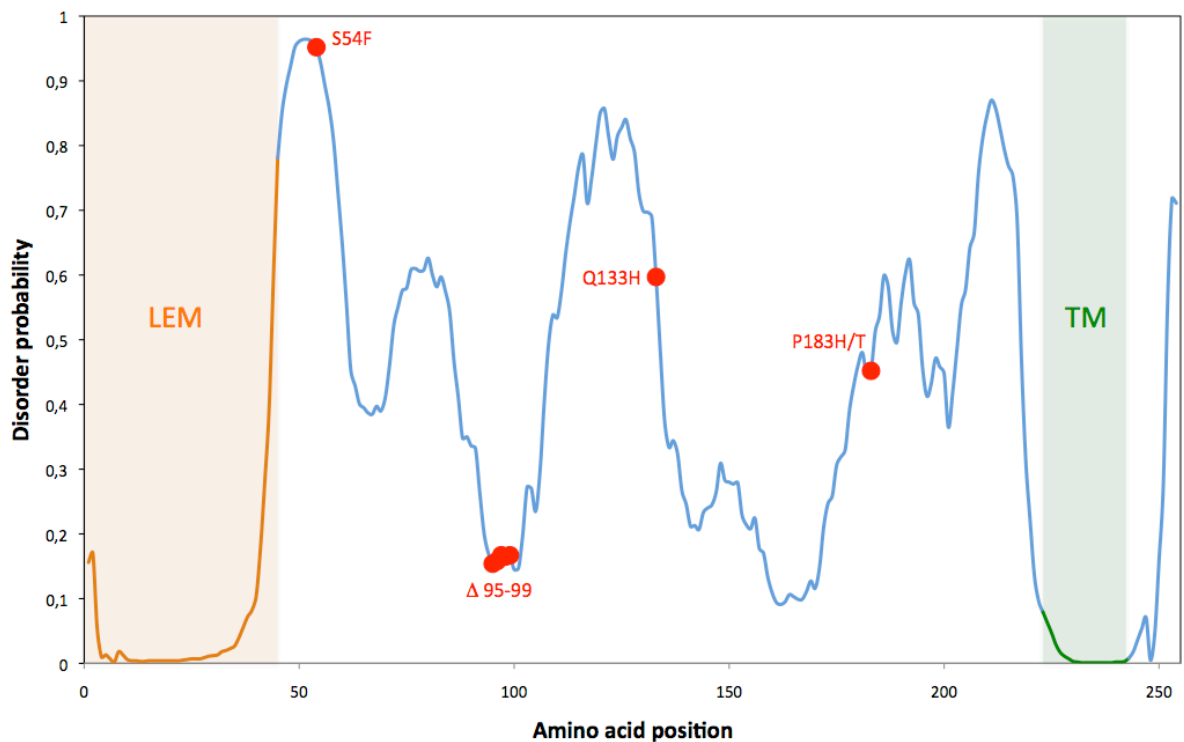


Figure 43 : Les mutants de l'EDMD liée à l'X sont localisés dans la partie désordonnée de l'émerine

Profil Disopred2.0²⁰⁰ de l'émerine entière. Les 5 mutations étudiées sont représentées par des points rouges.

On remarque que les résidus supprimés dans la mutation Del95-99 correspondent à une des deux régions présentant une probabilité de désordre faible, suggérant un possible repliement local. Notre hypothèse est que ces mutations pourraient modifier les capacités de l'émerine à s'auto-associer, à être phosphorylée ou bien encore à interagir avec ses partenaires.

IV.2.1. Expression des mutants X-EDMD

La quantification de l'expression de l'émerine WT et des mutants S54F, P183H, P183T et Del95-99 a été réalisée en transfectant ces constructions en fusion avec de la GFP dans des myoblastes C2C12 de souris ²⁰¹. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal en fluorescence et l'intensité de la GFP à l'enveloppe nucléaire a été quantifiée. L'émerine WT et les mutants sont correctement localisés à l'enveloppe nucléaire. Cependant, et de façon plus prononcée pour les mutants, l'émerine est retrouvée également dans des fractions cytosoliques de large taille. Ces autres fractions résultent probablement selon les auteurs de l'agrégation/précipitation dues à la transfection de quantités importantes d'émerine. Tous les mutants présentent une diminution de la fluorescence de la GFP à l'enveloppe nucléaire en comparaison de la protéine WT, suggérant soit une diminution de l'expression soit une mauvaise localisation.

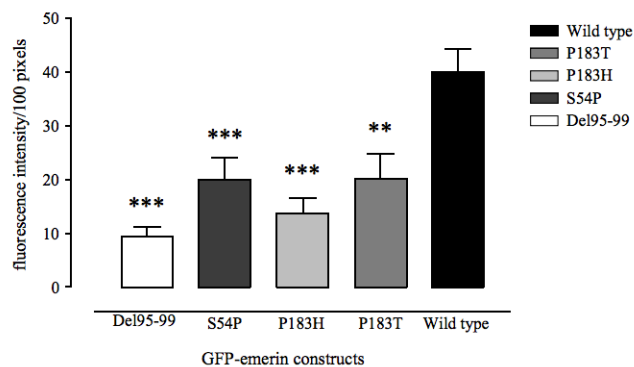


Figure 44 : Quantification des mutants de l'émerine à l'enveloppe nucléaire

La détermination par RT-PCR du taux d'ARN codant pour les émerines mutantes dans des cellules de patients, montrent que les mutations P183H et P183T ont des taux d'expression équivalents au contrôle (Wild Type) ²⁰² contrairement aux mutations Q133H et Del95-99 qui conduisent à une diminution du taux d'expression de l'émerine ^{203, 204}.

L'analyse par Immunoblotting montre que les mutants Q133H, P183H et P183T ne présentent pas de différence dans la migration sur gel SDS-PAGE alors que la délétion Del95-99 aboutit à une émerine présentant 2 bandes de poids moléculaires plus faibles.

IV.2.2. Localisation subcellulaire des mutants X-EDMD

L'étude de la localisation de l'émerine WT et des mutants P183H, P183T et Del95-99 dans les différents compartiments subcellulaires (Figure 45) montre de façon logique que l'émerine WT est majoritairement présente dans le noyau (P4) et légèrement dans le réticulum endoplasmique (P5).

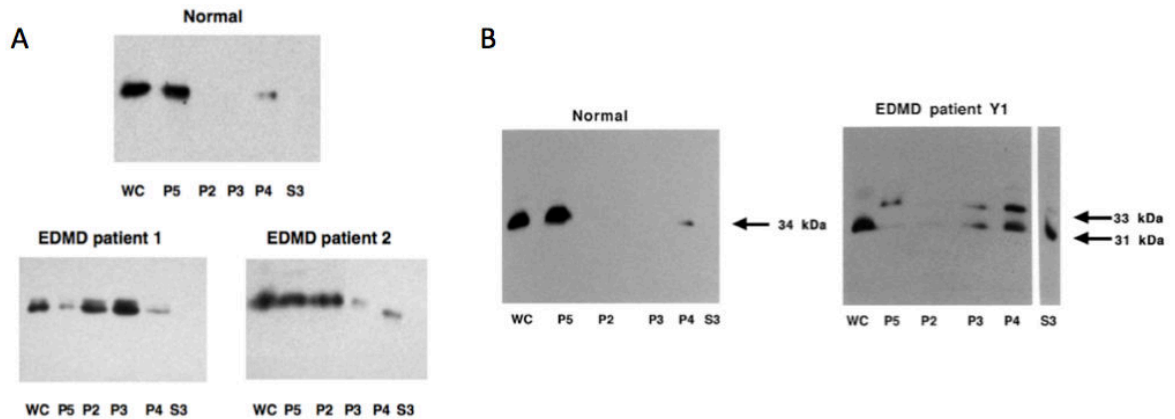


Figure 45 : Localisation subcellulaire des mutants P183H/T et Del95-99^{202, 204}

Distribution subcellulaire de l'émerine dans des lignées cellulaires provenant d'un contrôle (Normal) et de patients EDMD : **A.** EDMD patient 1 (P183H), EDMD patient 2 (P183T) et **B.** EDMD patient Y1 (Del95-99). Détection par des anticorps AP8. Les fractions observées sont : les cellules intactes (WC), les noyaux purs (P5), les culots enrichis en mitochondries (P2), les culots enrichis en membrane plasmique et lysosomes (P3), les culots enrichis en microsomes, fragments du réticulum endoplasmique (P4) et le cytosol (S3).

Pour les deux mutants P183H (EDMD patient 1) et P183T (EDMD patient 2), aucune augmentation de la quantité de protéine dans le réticulum endoplasmique (P4) n'a été observée, suggérant un bon repliement et aucune toxicité de ces mutants. Ces deux mutants ne sont plus confinés dans le noyau mais sont aussi retrouvés dans d'autres compartiments subcellulaires. Le mutant P183H, par exemple, n'est pratiquement pas présent dans le noyau (P5) et est retrouvé de façon surprenante dans les fractions membranaires plus lourdes (P2 : mitochondries et P3 : membrane plasmique et lysosome). Le mutant P183T, quant à lui, est distribué de façon égale entre le noyau (P5) et les mitochondries (P2 ; une des fractions membranaires plus lourdes). Le mutant Del95-99 présente 2 bandes sur gel SDS-PAGE à 31 et 33 kDa. Ces 2 bandes ne sont visibles que dans les fractions subcellulaires et ne sont pas observées dans les extraits cellulaires totaux (WC). Ce mutant est majoritairement localisé dans le réticulum endoplasmique (P4) mais est également retrouvé dans d'autres fractions membranaires lourdes (P3) et dans le noyau (P5) sous sa forme à 33 kDa et dans le cytoplasme (S3) sous sa forme à 31 kDa.

IV.2.3. Association des mutants X-EDMD à la lamina

Pour étudier la nature de l'association des émerines P183H, P183T et Del95-99 à la lamina nucléaire, des noyaux isolés ont été traités soit avec du Na₂CO₃ soit avec du triton TX100. Les résultats montrent une insolubilité totale du WT et des trois mutants montrant une association correcte à la membrane de ces mutants. Des concentrations croissantes en NaCl ont été ensuite ajoutées sur l'échantillon contenant 1% de triton TX100 (Figure 46).

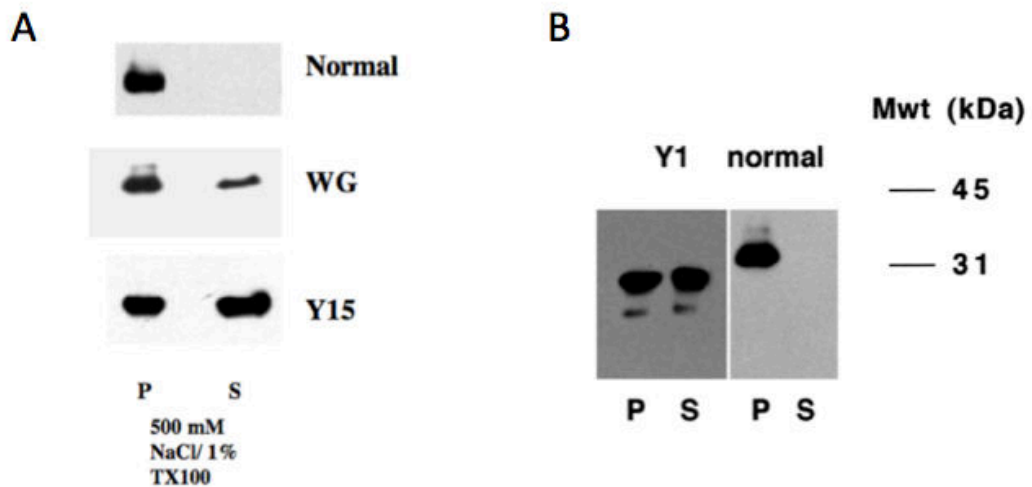


Figure 46 : Solubilité des mutants P183H, P183T et Del95-99 dans 500 mM NaCl ^{202, 204}

Des fractions nucléaires purifiées à partir de lignées cellulaires de lymphoblastes WT (Normal) ou provenant de patients EDMD A. WG = P183H et Y15 = P183T et B. Y1 = Del95-99, ont été traitées avec 500 mM NaCl et 1% de Triton TX100 puis déposées sur gel SDS-PAGE.

À une concentration de 500 mM NaCl, alors que l'émerine WT est totalement insoluble, les mutants P183H, P183T et Del95-99 sont approximativement solubles à 50%. Ceci montre une diminution de la force d'interaction de ces mutants avec la lamina nucléaire.

IV.2.4. Phosphorylation des mutants X-EDMD

L'étude des phosphorylations de l'émerine WT et du mutant Del95-99 endogènes en fonction du cycle cellulaire est présentée en [Figure 47](#).

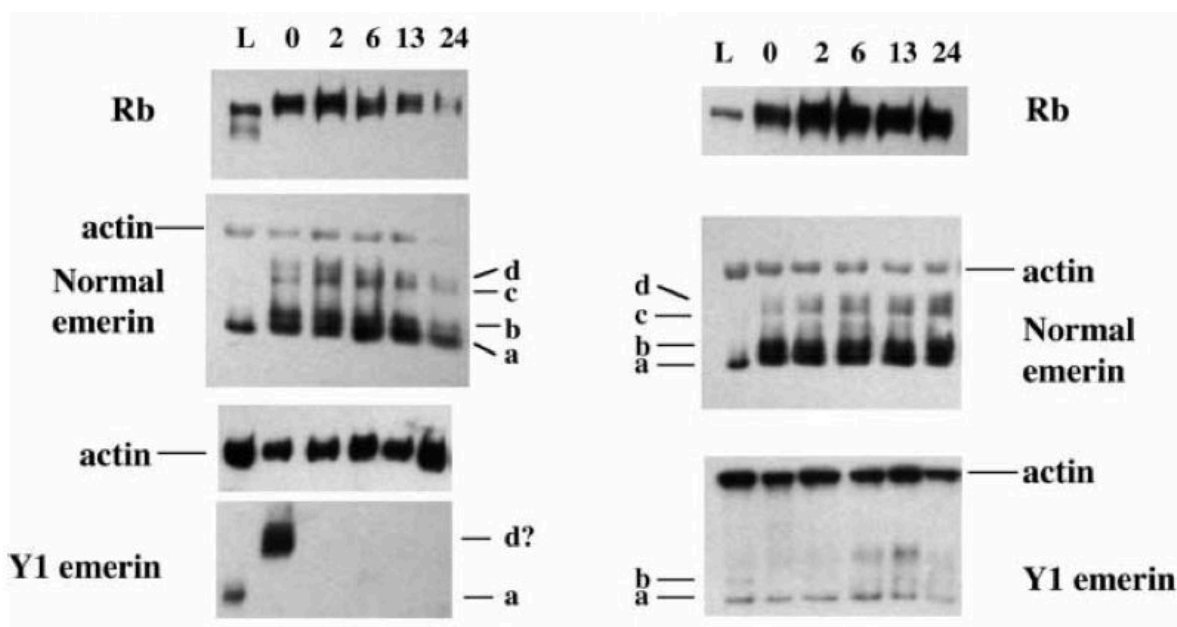


Figure 47 : Étude des phosphorylations de l'émerine Del95-99 en fonction du cycle cellulaire ²⁰⁴

L'étude des phosphorylations de l'émerine WT et du mutant Del95-99 endogènes en fonction du cycle cellulaire a été réalisée en synchronisant les cellules en métaphase avec du nocodazole (**Gauche**, puits L) ou en début de phase S avec de l'hydroxyurée (**Droite**, puits L). Les deux inhibiteurs ont ensuite été retirés et des échantillons ont été prélevés et déposés sur gel SDS-PAGE à différents temps (0, 2, 6, 13 et 24 heures).

L'émerine WT est phosphorylée en métaphase et présente 1 bande (a) sur gel SDS-PAGE. 3 bandes supplémentaires (b, c et d) apparaissent avec le temps après élimination du nocodazole (phase G1). En phase S, l'émerine WT présente exactement le même profil, avec une phosphorylation majeure (bande a) qui ne disparaît pas avec le temps et l'apparition en phase G2 des trois bandes supplémentaires (b, c et d). La phosphorylation mitotique de l'émerine (bande a) semble donc avoir un turnover très lent puisqu'elle est encore présente en phase G1, S et G2.

Le mutant Del95-99 est très différent du WT, il présente une phosphorylation en métaphase (bande d) qui disparaît très rapidement (au bout de 2 heures) et ne présente aucune phosphorylation supplémentaire (a, b, c) en G1. En début de phase S, ce mutant n'est que très faiblement phosphorylé (bandes a et b) et ces phosphorylations ont un turnover très lent puisqu'elles restent présentes en G2.

IV.2.5. Interactions avec les partenaires

L'effet de 5 mutations (S54F, Q133H, P183H, P183T et Del95-99) sur les interactions de l'émerine avec certains de ses partenaires a été étudié par des expériences de Coimmunoprécipitation ou Pulldowns (Figure 48). On observe sur la Figure 48 que les propriétés de liaison du mutant P183T n'ont pas été étudiées. Ce que l'on peut retenir de ces résultats est que l'interaction de l'émerine avec HDAC3 est rompue pour tous ces mutants. L'interaction avec BAF ne semble pas être affectée par ces mutations (à l'exception de Q133H pour lequel aucune donnée n'existe). La mutation Del95-99 empêche l'interaction de l'émerine avec la lamine A. Enfin l'interaction entre l'émerine et l'actine ou MAN1 est inexistante pour les mutants Del95-99 et Q133H.

	S54F	Δ95-99	Q133H	P183H
BAF	+	+	nt	+
Lamin A	+		nt	+
GCL	+		+	+
Btf			+	+
YT521-B	nt	nt	+	+
Lmo7	+	+	+	
HDAC3				
Actin	+			+
MAN1	+			+

Figure 48 : Effet des mutations causant l'X-EDMD sur la liaison de l'émerine à certains de ses partenaires

193

La force de l'interaction est représentée par des signes + et – en comparaison au WT. Nd = expérience non réalisée.

V. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE THÈSE

Les lamines forment un réseau dense à l'interface entre la membrane nucléaire interne et la chromatine. Elles influencent la forme du noyau et sa position dans la cellule, elles ont un rôle critique dans l'organisation du génome et influencent la réplication, la transcription et la réparation des gènes. Leurs mutations causent un grand nombre de maladies génétiques. Or, au niveau moléculaire, aucune donnée structurale n'existe décrivant l'interaction des lamines avec leurs partenaires au sein du noyau.

Le LBSR (Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie) travaille depuis une quinzaine d'années sur la caractérisation structurale des protéines de l'enveloppe nucléaire interne et des protéines de la réponse aux dommages de l'ADN.

Le but de ma thèse est de contribuer à la description du réseau d'interactions impliquant les lamines en caractérisant les détails moléculaires de ces interactions *in vitro* ou en extraits cellulaires.

Au début de ma thèse, plusieurs papiers avaient proposé que les lamines A jouaient un rôle essentiel dans la réponse aux dommages de l'ADN en interagissant directement avec des protéines de la signalisation de ces dommages. L'idée était qu'il fallait expliquer pourquoi des mutations dans les lamines provoquaient un syndrome de vieillissement prématuré. Ce type de pathologies avait été jusque là associé à des mutations dans des protéines de réponse aux dommages de l'ADN ²⁰⁵. Par analogie il avait été mis en avant le fait que si la lamine A participait à la réponse aux dommages de l'ADN, alors des défauts dans cette lamine pouvaient provoquer un dysfonctionnement des mécanismes de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN. Ces mécanismes sont de plus étudiés par plusieurs équipes du CEA de Saclay et de Fontenay-aux-Roses. Je devais donc, en collaboration avec ces équipes, analyser les interactions directes entre lamine A et les protéines de la réponse aux dommages de l'ADN.

Cependant, lors de ma thèse, ni nous ni les autres équipes travaillant sur le sujet dans le monde n'ont pu mettre en évidence d'interaction directe entre la lamine A et des protéines impliquées dans la signalisation des dommages de l'ADN, comme 53BP1, des protéines impliquées dans la compaction de la chromatine, comme l'histone H1, des facteurs de transcription impliqués dans la réponse à un stress oxydatif, comme Oct1 ou encore des protéines de la réplication de l'ADN, comme PCNA. Je ne présenterai donc pas cette partie de mon travail.

En revanche, plusieurs publications sont parues pendant ma thèse, qui suggéraient que les protéines de l'enveloppe nucléaire et en particulier les lamines et leurs partenaires, jouaient un rôle essentiel dans la réponse à un stress mécanique sur la cellule. De plus, le rôle des évènements de phosphorylation et d'oligomérisation de ces protéines a été mis en avant dans la régulation de l'assemblage de l'enveloppe nucléaire. J'ai donc été convaincue qu'il me fallait d'abord comprendre quels étaient les évènements moléculaires essentiels à l'assemblage de l'enveloppe nucléaire avant de pouvoir comprendre comment cette enveloppe répondait à un stress et en particulier comment ce type de stress modifiait les propriétés de liaison de l'enveloppe nucléaire. Je présenterai ici l'analyse des évènements d'oligomérisation et de phosphorylation que j'ai observés chez l'un des partenaires fonctionnellement essentiels de la lamine A, qui est la protéine émerine. Puis je discuterai comment ces évènements influencent la liaison de l'émerine à la lamine A, et je proposerai des pistes expérimentales pour tester les hypothèses émises.

RÉSULTATS

I. L'INTERACTION ÉMERINE-LAMINE A AU CŒUR DES FONCTIONS NUCLÉAIRES

L'interaction émerine – lamine A est indispensable pour la localisation correcte de l'émerine à la membrane nucléaire interne. Elle est aussi impliquée dans de nombreux processus cellulaires (Figure 49) comme l'interaction entre l'INM et la chromatine (rouge), la connexion physique entre le nucléosquelette et le cytosquelette (bleu) ou encore différentes voies de signalisation (vert). Des mutations dans l'une de ces deux protéines conduisent, entre autres, à la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD), rendant cette interaction cruciale pour le bon fonctionnement nucléaire et cellulaire.

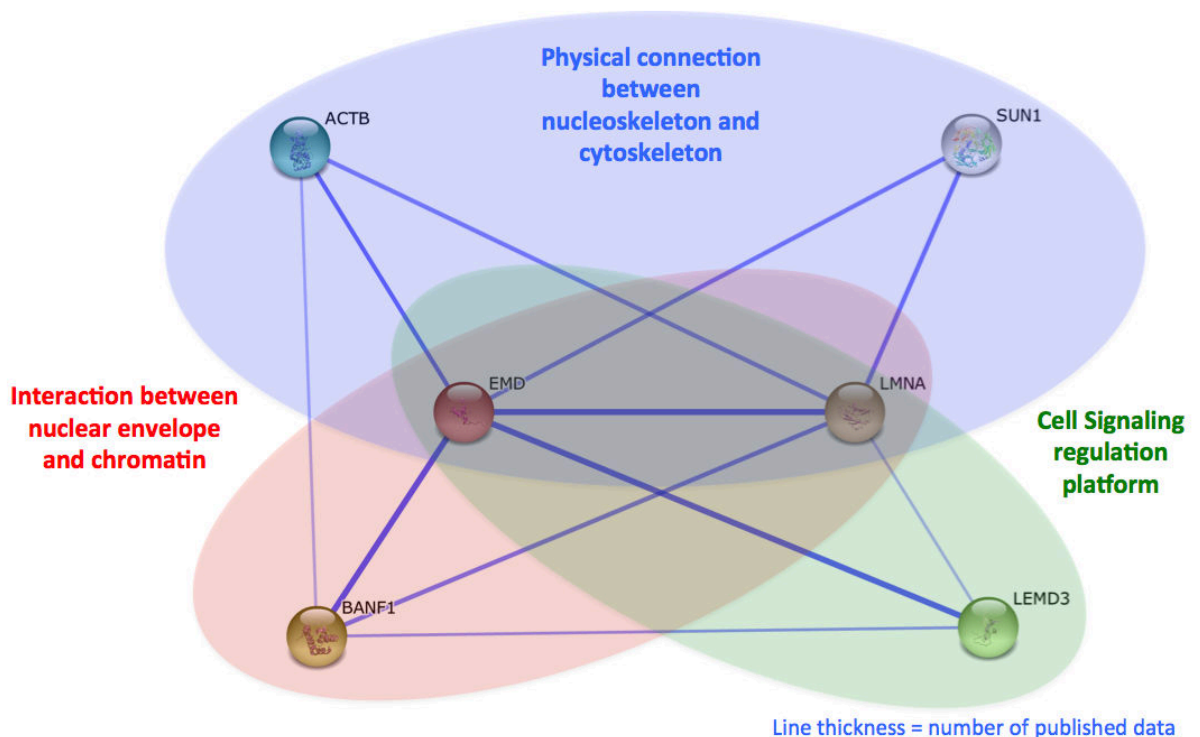


Figure 49 : L'interaction émerine - lamine A au cœur des processus cellulaires

Schéma non exhaustif obtenu à l'aide du logiciel String 10²⁰⁶. Chaque sphère correspond à une protéine (annotée avec le nom de son gène, *ACTB* pour l'actine, *SUN1* pour SUN1, *EMD* pour l'émerine, *LMNA* pour les lamines de type A, *BANF1* pour BAF et *LEMD3* pour Man1). Les lignes représentent les interactions connectant les deux partenaires entre eux et l'épaisseur de la ligne correspond au nombre de données publiées sur cette interaction. Enfin les cercles colorés représentent 3 processus cellulaires impliquant l'émerine et les lamines de type A.

Cette interaction émerine – lamine A a été observée de nombreuses fois dans la littérature par différentes techniques^{207,208, 209}. D'après ces résultats, je peux déterminer les régions d'interaction comme étant la région nucléoplasmique de l'émerine (70-164) et le domaine « queue » en C-terminal des lamines A (384-664).

Nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Brigitte Buendia à l'université Paris Diderot, ont regardé les proximités entre la GFP-émerine transfectée dans des cellules HeLa et les lamines A/C endogènes grâce à des expériences de PLA (Proximity Ligation Assay) (Figure 50).

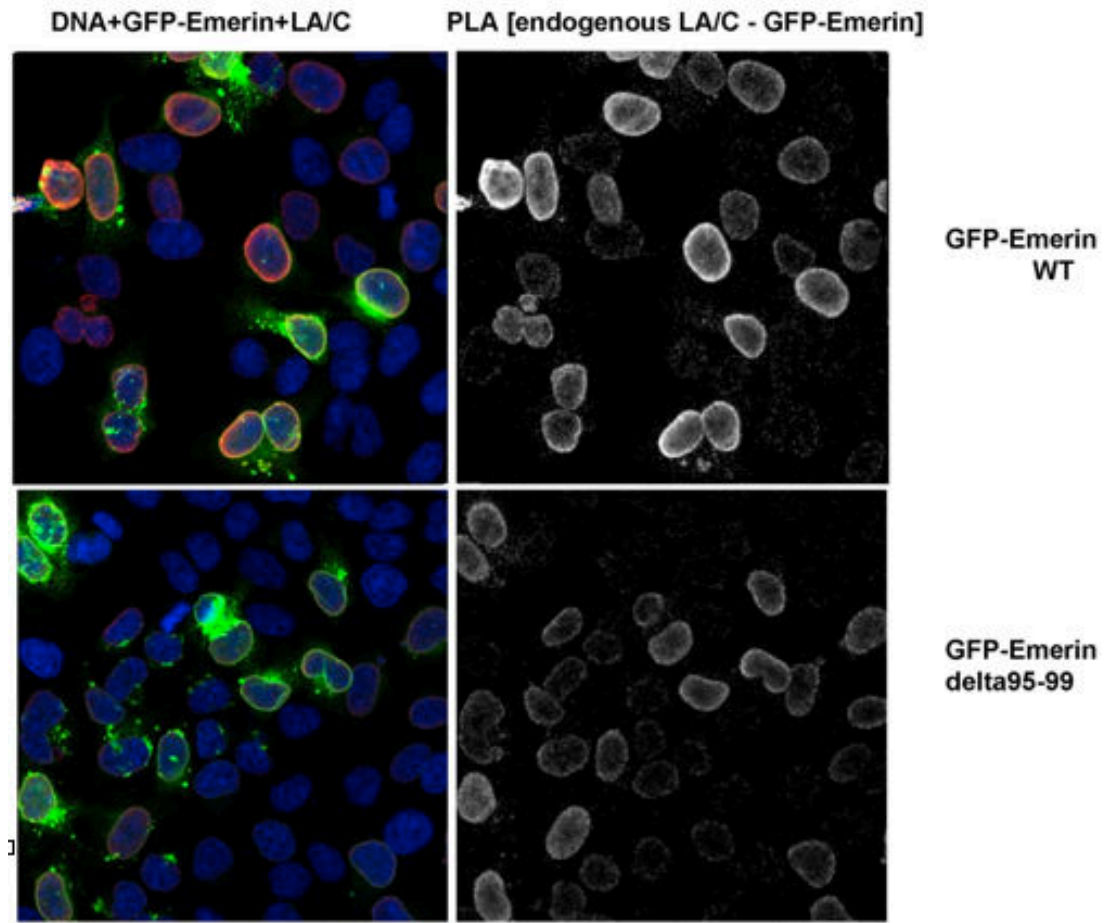


Figure 50 : PLA émerine - lamine A dans des cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 1 plasmide codant pour GFP-émerine. La détection se fait d'abord par ajout d'anticorps primaires (anticorps de souris anti-GFP et anticorps de lapin anti-lamine A/C) puis par des anticorps secondaires Duolink couplés à des oligonucléotides (PLA probe anti-mouse minus et PLA probe anti-rabbit plus). Les réactifs de détection Duolink sont ensuite ajoutés, permettant d'observer un point rouge chaque fois que les 2 anticorps secondaires moins et plus sont proches dans l'espace.

Le PLA montre des proximités spatiales entre la GFP-émerine et les lamines de type A/C endogènes au niveau de la périphérie nucléaire. Ces résultats confirment encore qu'il existe une interaction entre émerine et lamine A/C *in vivo*.

J'ai donc essayé de reproduire cette interaction *in vitro* par RMN, avec des protéines recombinantes. L'émerine 1-187 a été produite et purifiée avec une filtration sur gel (GF) comme dernière étape de purification.

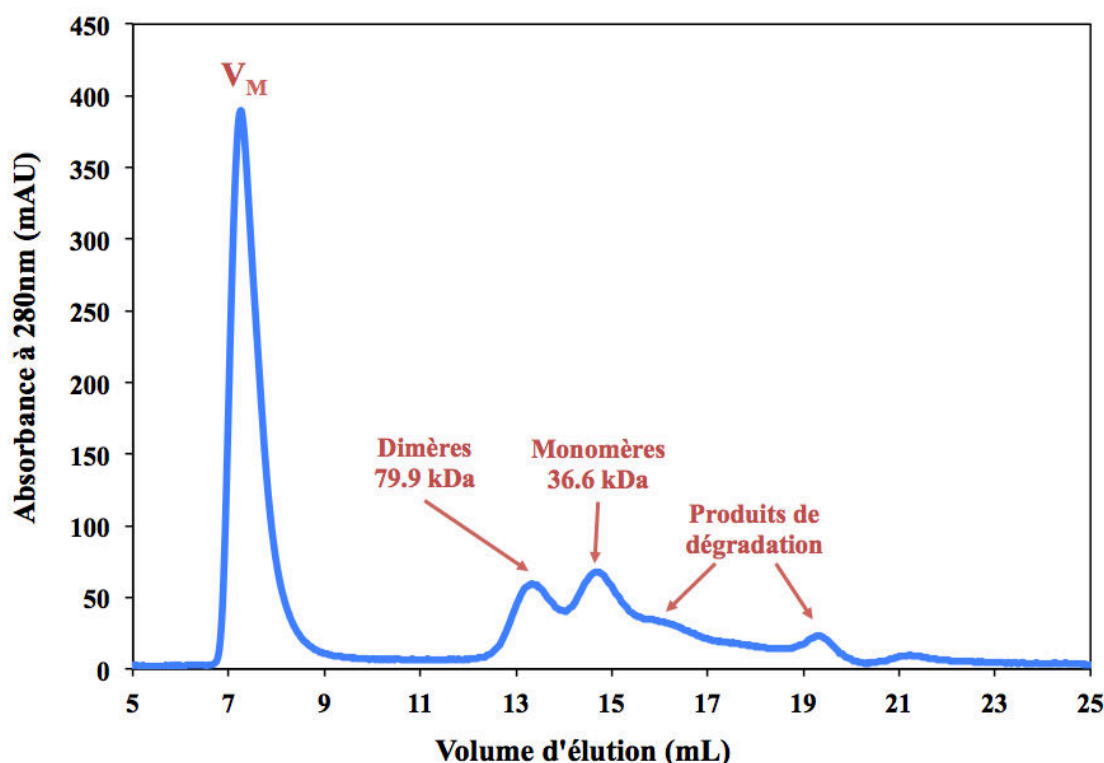


Figure 51 : Filtration sur gel de l'émerine 1-187

Chromatogramme de la filtration sur gel de l'émerine 1-187 sur Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) dans un tampon 50 mM Tris pH 8 et 50 mM NaCl. Le chromatogramme présente plusieurs pics. Le pic majoritaire à 7.25 mL correspond au volume mort de la colonne et donc à des espèces de très haut poids moléculaire ou agrégats. Deux pics à 13.3 mL et 14.6 mL correspondent respectivement aux dimères et monomères après calcul des poids moléculaires par calibration de la colonne. Enfin un épaulement vers 16.1 mL et un pic à 19.2 mL correspondent à des produits de dégradations de l'émerine 1-187.

Le chromatogramme obtenu (Figure 51) présente différents pics à différents volumes d'élution, correspondant aux monomères, dimères et possiblement à des espèces plus grosses. L'émerine est visible sur gel SDS-PAGE dans toutes les fractions déposées, correspondant aux différents pics. Pour l'étude de l'interaction avec la lamine A, j'ai sélectionné les fractions correspondant au pic du monomère d'émerine (volume d'élution de 14.6 mL).

La lamine A testée quant à elle est la construction 389-646 couplée à une étiquette GST clivable à la thrombine. Sur gel SDS-PAGE (Figure 52), la lamine A 389-646 présente de façon surprenante 4 bandes.

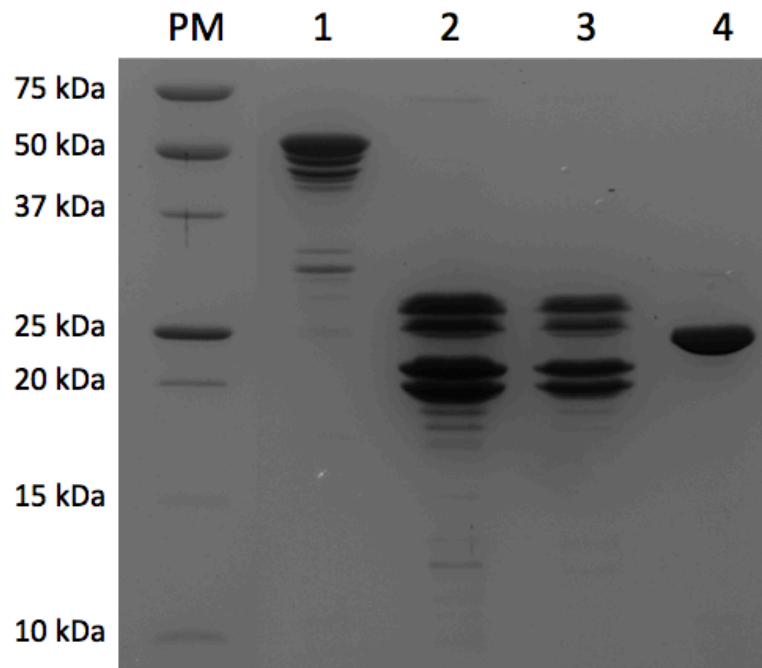


Figure 52 : Gel SDS-PAGE de la purification de la lamine A 389-646

PM correspond au marqueur de poids moléculaire. Le puits 1 est la protéine avant coupure à la thrombine, les puits 2 et 3 correspondent à la lamine A 389-646 clivée et le puits 4 correspond à l'étiquette GST seule.

Il se trouve que le gène que j'ai utilisé n'est pas optimisé pour la production dans *E. coli* et qu'il contient plusieurs fois un codon rare pour la bactérie mais très commun chez l'homme, CCC (Proline), ce qui pourrait induire des arrêts de la traduction dans la bactérie et aboutir à la production du fragment de lamine A 389-646 entier mais également à la production de 3 autres formes tronquées en C-terminal. Il faudrait analyser ces 4 bandes obtenues par spectrométrie de masse pour confirmer cette hypothèse.

Je n'ai observé aucune interaction entre la lamine A 389-646 et les monomères d'émerine 1-187 par RMN (Figure 53).

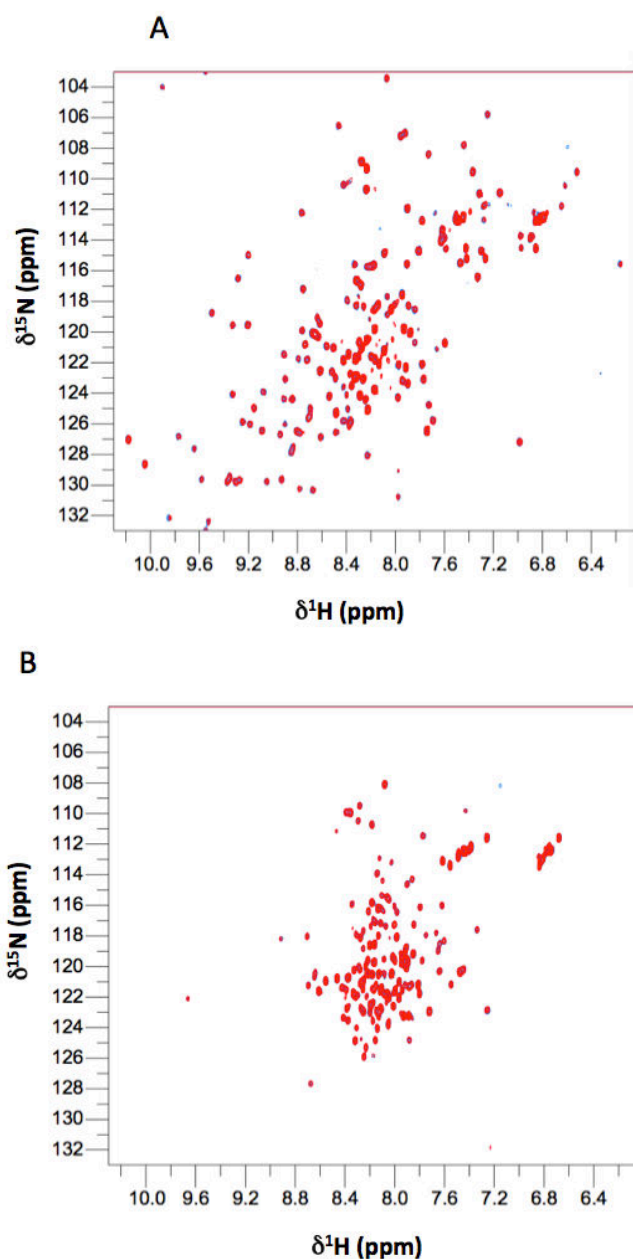


Figure 53 : Interaction émerine – lamine A 389-646 par RMN

Tampon utilisé : 50 mM Phosphate pH 6.7, 150 mM NaCl, et 1 mM TCEP. **A.** Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 389-646 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence de 100 μM d'émerine 1-187 (en rouge). **B.** Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de l'émerine 1-187 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence de 100 μM de lamine A 389-646 (en rouge).

Il est possible que cette interaction nécessite un état oligomérique particulier d'une des deux protéines, des modifications post-traductionnelles ou bien la présence d'un troisième partenaire (BAF par exemple). J'ai donc décidé d'étudier l'état oligomérique de l'émerine ainsi que ses modifications post-traductionnelles afin de tester leur impact sur cette interaction.

II. ETUDE DE L'ÉMERINE, UNE PROTÉINE LEM AUX MULTIPLES FONCTIONS

II.1. CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE L'ÉMERINE

Cette caractérisation structurale de l'émerine et de ses mutants EDMD a fait l'objet d'un article soumis à Human Molecular Genetics et auquel j'ai contribué. Cet article est présenté en Annexes.

II.1.1. L'émerine, une protéine de l'INM majoritairement désordonnée

L'émerine est ancrée à la membrane nucléaire interne par son domaine transmembranaire (TM). Le reste de la protéine (des résidus 1 à 223) est localisé dans le nucléoplasme. En dehors de son domaine transmembranaire, l'émerine possède un second et unique domaine structuré appelé domaine LEM (1-45) (Figure 54). Les résidus 45 à 223 sont prédits comme désordonnés par Disopred2.0, cependant, deux régions autour des résidus 86-96 et 144-173, présentent une probabilité de désordre faible, suggérant un possible repliement local.

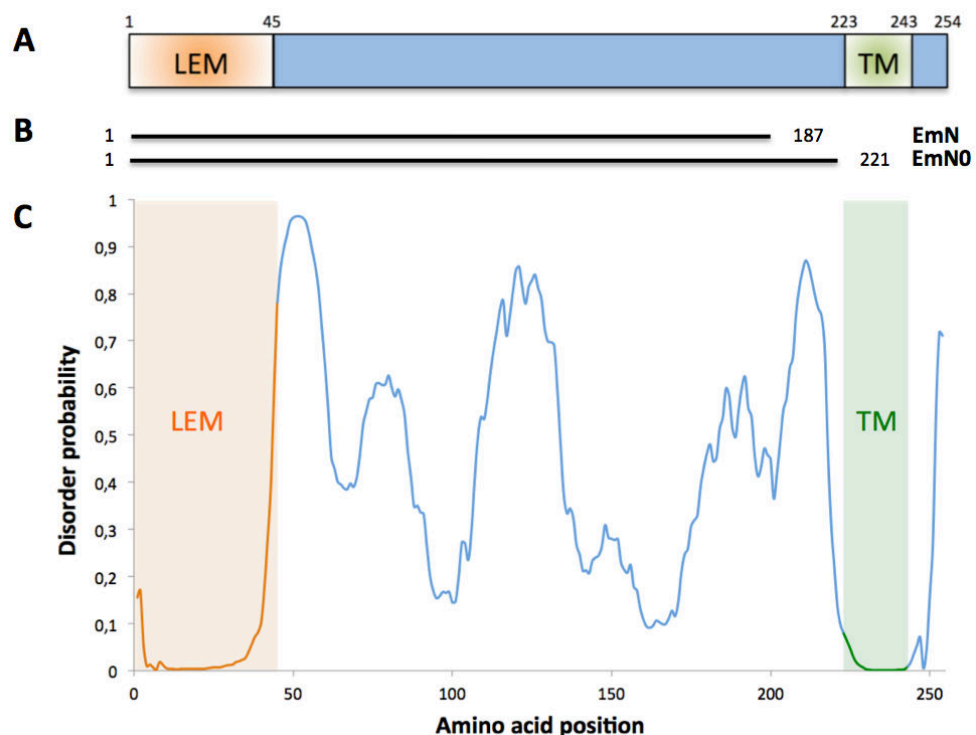


Figure 54 : L'émerine 1-187 est prédite comme principalement désordonnée

A. Représentation schématique de l'émerine. Le domaine LEM est en orange (1-45) et le domaine transmembranaire en vert (TM : 223-243). B. Constructions sur lesquelles j'ai travaillé : EmN (1-187) et EmN0 (1-221). C. Profil Disopred2.0²⁰⁰ de l'émerine. Les domaines structurés de l'émerine sont représentés avec les mêmes couleurs que sur la figure A.

Une autre caractéristique conformationnelle a été observée dans une étude visant à produire des anticorps anti-émerine. Ces anticorps ont été fabriqués en produisant l'émerine dans *E.coli* et en l'utilisant comme immunogène dans des souris BALB/c ²¹⁰. Les séquences reconnues par ces anticorps ont ensuite été déterminées par phage display en utilisant des banques de peptides ²¹¹. Alors que la majorité de ces anticorps reconnaissent une seule séquence spécifique de l'émerine, un anticorps (NAMEM5) a été montré capable de reconnaître des peptides provenant de deux régions distinctes de l'émerine (résidus 112-115 et résidus 150-152 + 156-158). Il est possible que cet anticorps reconnaisse un épitope conformationnel créé par le repliement de la protéine au niveau de ces deux régions.

J'ai lors de ma thèse, essayé de produire et de purifier deux constructions différentes de cette protéine (Figure 54B), contenant les résidus 1 à 187 (EmN) ou les résidus 1 à 221 (EmN0). Ces constructions ont été exprimées comme protéines de fusions avec une étiquette de 8 histidines et un site de coupure à la TEV. La production de ces deux constructions est très efficace, conduisant à des niveaux d'expression de plusieurs milligrammes de protéines par litre de culture. Cependant, les protéines exprimées se retrouvent essentiellement en corps d'inclusion (Figure 55), m'obligeant à adopter une purification en conditions dénaturantes (8 M urée). L'avantage d'exprimer des protéines en corps d'inclusions est que la pureté de ces dernières est presque parfaite après une seule étape de purification.

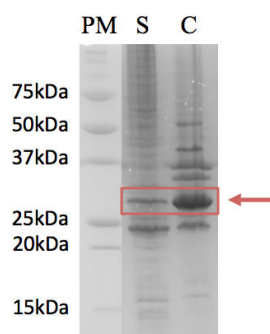


Figure 55 : Gel SDS-PAGE des fractions bactériennes contenant l'émerine 1-187

Le premier puits à gauche correspond au marqueur de poids moléculaire. Les puits S et C correspondent respectivement au Surnageant et au Culot de la lyse classique.

Il m'a été impossible d'obtenir l'émerine 1-221 soluble. Quelles que soient les conditions de renaturation utilisées, la protéine s'agrège. Un autre groupe s'est confronté au même problème de solubilité concernant une construction proche (1-220) ¹⁹⁵. J'ai donc consacré la totalité de l'étude à la construction 1-187 que j'appellerai simplement émerine tout au long de cette thèse.

Le protocole de purification que j'ai adopté est très simple : après une lyse classique des bactéries, le culot (contenant les corps d'inclusion et donc la protéine presque pure) est dissous dans le tampon C8, contenant 8 M d'urée et 40 mM d'imidazole. La protéine est ensuite purifiée sur une colonne d'affinité (Figure 56) grâce à son étiquette poly-histidine. Elle est éluée directement avec 100% de tampon d'éluion E8, identique au tampon C8 mais avec 1 M d'imidazole.

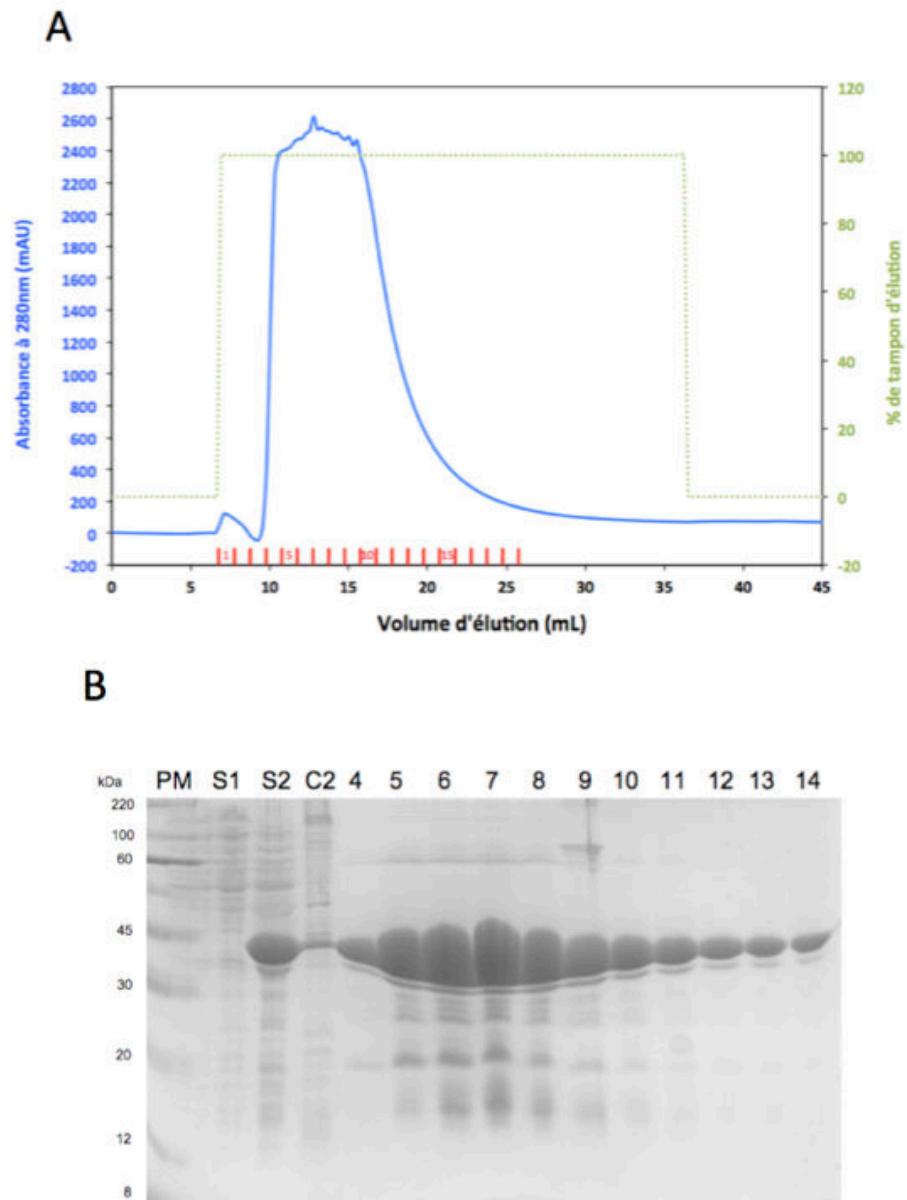


Figure 56 : Purification de l'émerine par chromatographie d'affinité

A. Chromatogramme de l'élution de l'émerine de la colonne d'affinité Histrap (Ni-NTA) avec un tampon contenant 1 M d'imidazole. **B.** Gel SDS-PAGE correspondant à cette purification. S1 est le surnageant après la lyse classique, S2 et C2 correspondent aux surnageant et culot après resuspension dans l'urée. Les fractions 4 à 14 correspondent à l'élution de la colonne d'affinité.

La protéine est ensuite repliée soit par filtration sur gel (GF) (Figure 57) et les monomères d'émerine sont sélectionnés (comme lors de l'étude de son interaction avec la lamine A, voir paragraphe précédent), soit par dialyses successives afin d'éliminer l'urée et l'imidazole.

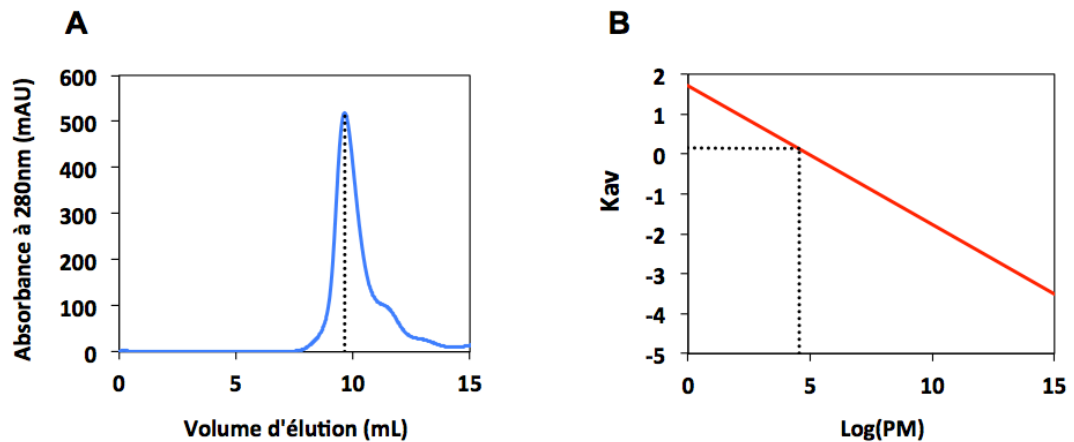


Figure 57 : Filtration sur gel de l'émerine

A. Chromatogramme de la filtration sur gel (GF) des monomères d'émerine (une première GF a été réalisée afin de ne sélectionner que les monomères) sur Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) dans un tampon 50 mM Phosphate pH 6.7, 150 mM NaCl et 1 mM TCEP. B. Calibration de la même Superdex dans le même tampon en utilisant des protéines globulaires de taille connue.

L'émerine a une masse molaire théorique de 24 281.1 Da, un pI de 5.67 et un epsilon molaire de 26 820. Sur GF (Figure 57A) les monomères de cette protéine ont un volume d'élution de 9.65 mL. Je peux ainsi calculer le $K_{av} = (V_e - V_M) / (V_T - V_M)$. Avec V_e = volume d'élution de la protéine, V_M = volume mort de la colonne et V_T = volume total de la colonne. K_{av} (monomères d'émerine) = 0.1. En reportant cette valeur sur la courbe de calibration (Figure 57B), j'obtiens, pour les monomères d'émerine, un $\log(PM)$ de 4.55 soit un PM (poids moléculaire) de 35 673 Da. De la même manière, sur gel SDS-PAGE (Figure 58), l'émerine a un poids moléculaire apparent plus élevé que son poids moléculaire théorique. Ceci est expliqué par la nature désordonnée de la protéine.

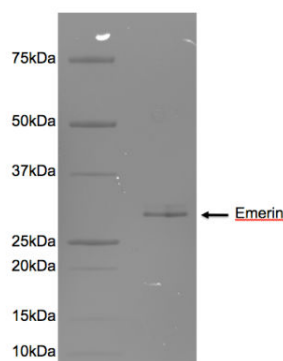


Figure 58 : Gel SDS-PAGE de l'émerine en fin de purification

J'ai tout d'abord préparé un échantillon d'émerine pour la RMN, afin de connaître l'état de structuration de ma protéine.

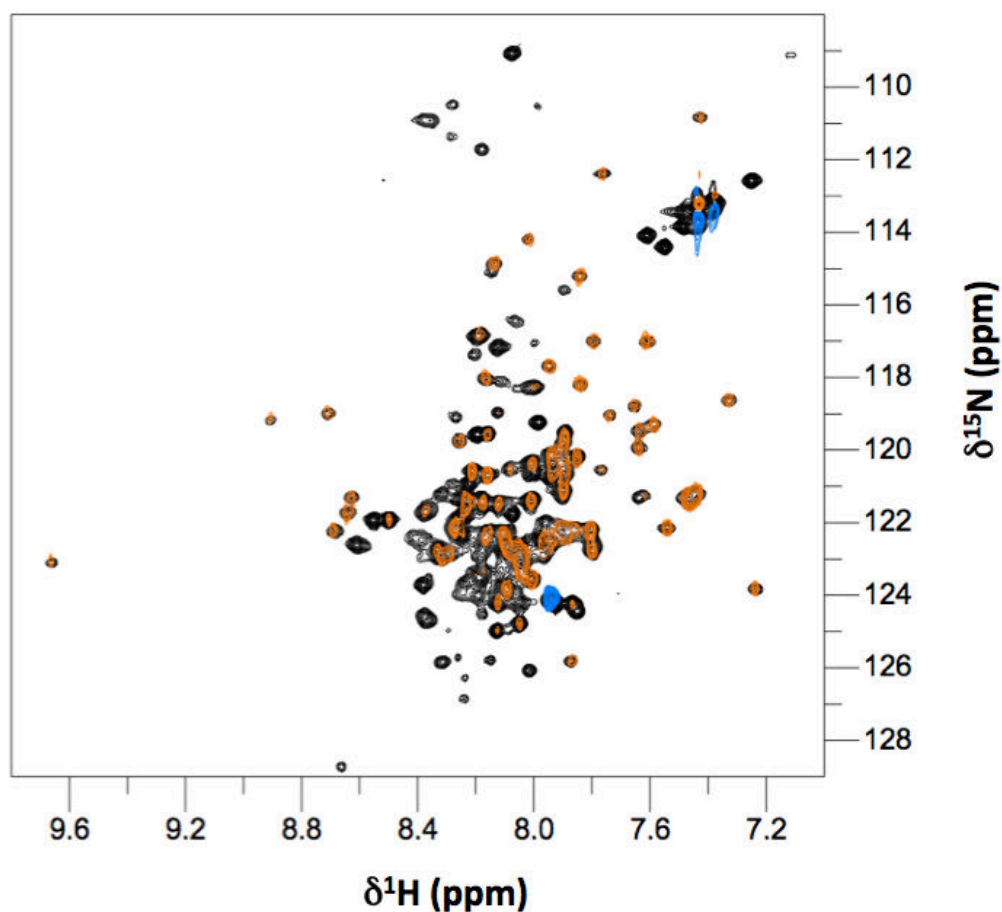


Figure 59 : Spectres RMN à 2D d'un échantillon d'émerine

Superposition du spectre ^1H - ^{15}N -HSQC de l'émerine (noir) et du spectre faisant apparaître les valeurs des couplages dipolaires nOe ^1H - ^{15}N (pics positifs en orange et pics négatifs en bleu). Expériences RMN réalisées sur un échantillon d'émerine à 86.2 μM dans 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 150 mM NaCl et 1 mM DTT et lancées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

D'après les expériences de RMN (Figure 59), l'émerine présente un spectre HSQC avec une majorité de signaux protons (^1H) compris entre 7.8 et 8.4 ppm. Cette faible distribution des résonances protons du squelette suggère que l'émerine est largement désordonnée. L'expérience permettant la mesure des nOes hétéronucléaires ^1H - ^{15}N le confirme. Les pics positifs en orange correspondent aux régions rigides et ordonnées (domaine LEM, dont l'attribution des protons est disponible au laboratoire ²¹²), le pic bleu correspond à un résidu complètement désordonné (probablement le résidu en C-terminal de la protéine) et les pics invisibles sur l'expérience permettant la mesure des nOes hétéronucléaires (visibles uniquement sur le spectre HSQC en noir) correspondent à des résidus très flexibles. En dehors de son domaine LEM, l'émerine est donc très flexible.

II.1.2. L'émerine 1-187 est capable de s'auto-associer *in vitro*

II.1.2.a. L'émerine 1-187 existe *in vitro* sous forme de monomères, dimères et gros oligomères

Il avait été évoqué dans une étude d'interaction par double hybride, que la région nucléoplasmique de l'émerine (1-225) était capable d'interagir avec elle-même (Figure 60)¹⁹⁵.

lamin A binds to emerin more strongly than lamin C. It was also shown that molecules of C-terminus truncated emerin bind to each other. This indicates that C-terminus truncated emerin can form homodimers or multimers.

Figure 60 : Première suggestion d'une interaction émerine-émerine¹⁹⁵

Un papier récent propose que cette oligomérisation repose essentiellement sur deux régions de l'émerine, les régions R (186-220) et S (147-174)²¹³. Ces régions s'associeraient de deux manières différentes R-R ou R-S pour permettre à l'émerine de former des oligomères à l'enveloppe nucléaire (Figure 61). De plus la région 170-220 interagirait avec le domaine LEM, ce qui régulerait l'interaction du domaine LEM de l'émerine avec sa cible BAF.

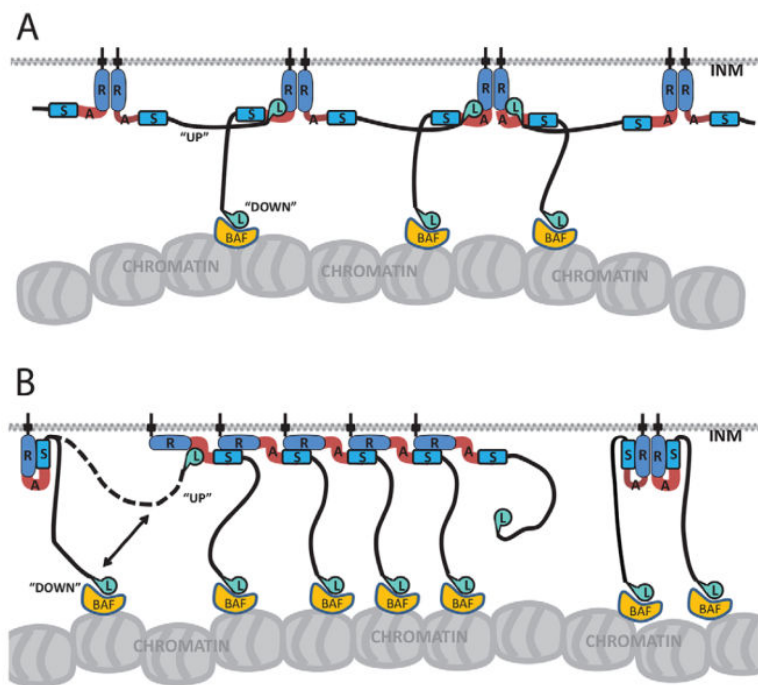


Figure 61 : Modèles de l'association intermoléculaire de l'émerine²¹³

Représentation des modèles des interactions R-R (A) et R-S (B) : dans une des positions hypothétiques « up », l'émerine est associée au squelette, et dans l'autre « down », l'émerine est associée à BAF.

Afin d'étudier les différents états oligomériques de l'émerine, j'ai replié la protéine en éliminant l'urée après purification grâce des bains de dialyse successifs (1 nuit, 1h et 1h avec un facteur de dilution de 500). Contrairement à la filtration sur gel (GF) qui élimine les gros oligomères (ne passant pas le pré-filtre), la dialyse me permet de conserver toutes les espèces oligomériques présentes dans l'échantillon.

J'ai alors étudié l'émerine 1-187 par ultracentrifugation analytique (UCA) en faisant varier différentes conditions comme le pH ou encore la concentration en sel. Les expériences en pH n'ont donné des résultats analysables que pour un pH de 8. L'émerine s'est agrégée ou a précipité à pH 7 et pH 5 (son point isoélectrique est à 5.67 avec l'étiquette histidine et 5.02 sans étiquette).

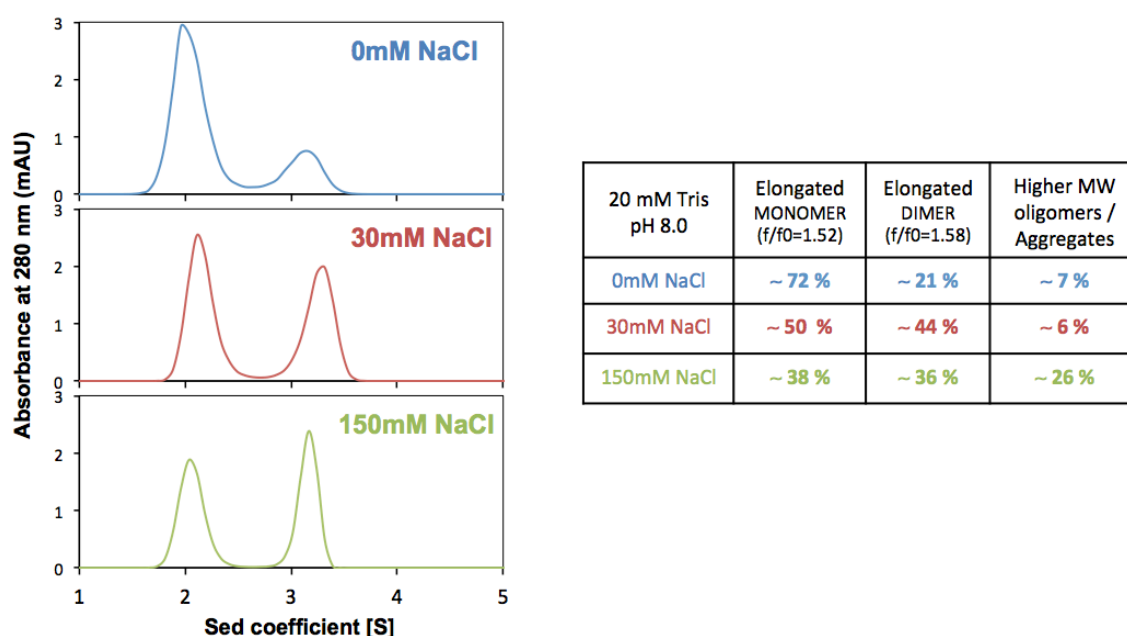


Figure 62 : Vitesse de sédimentation de l'émerine 1-187 dans différentes concentrations en NaCl par UCA

Résultats obtenus sur un échantillon d'émerine 1-187 à 20 μ M dans 20 mM Tris-HCl, pH 8 et différentes concentrations en NaCl (0, 30 et 150 mM).

Les résultats de vitesse de sédimentation dans différentes concentrations en NaCl (Figure 62), montrent la présence de 3 espèces qui pourraient correspondre au monomère allongé (coefficient de sédimentation de 2.1 S et ratio de friction de 1.52), au dimère allongé (coefficient de sédimentation de 3.2 S et ratio de friction de 1.58) et à des oligomères de plus haut poids moléculaire ou agrégats présents en grande quantité dans la condition avec le plus de NaCl, suggérant une auto-association médiée par des interactions hydrophobes.

Afin de déterminer la masse exacte des deux populations de petits oligomères, observées en vitesse de sédimentation, une étude d'équilibre de sédimentation a été réalisée sur un échantillon d'émerine à différentes concentrations (Figure 63). Les deux populations observées précédemment correspondent bien aux monomères et dimères allongés.

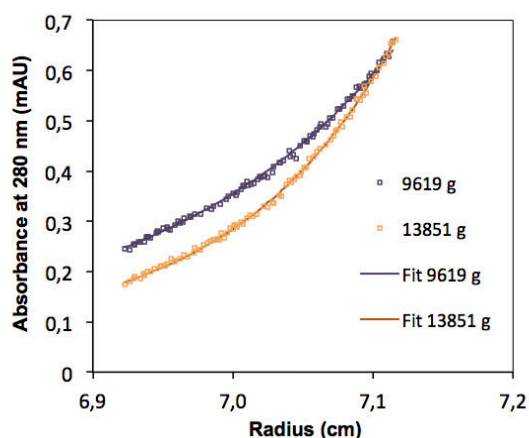


Figure 63 : Équilibre de sédimentation de l'émerine 1-187

Résultats obtenus sur un échantillon d'émerine à 17.4 μM dans 20 mM Tris-HCl, pH 8 à 9619xg (violet) ou 13851xg (orange). Des résultats similaires ont été obtenus sur deux autres échantillons à 10.3 μM et 6.8 μM .

Une confirmation de ces masses observées a été obtenue grâce à des expériences de SEC-MALS (Figure 64). Je retrouve bien des valeurs correspondantes aux monomères et dimères.

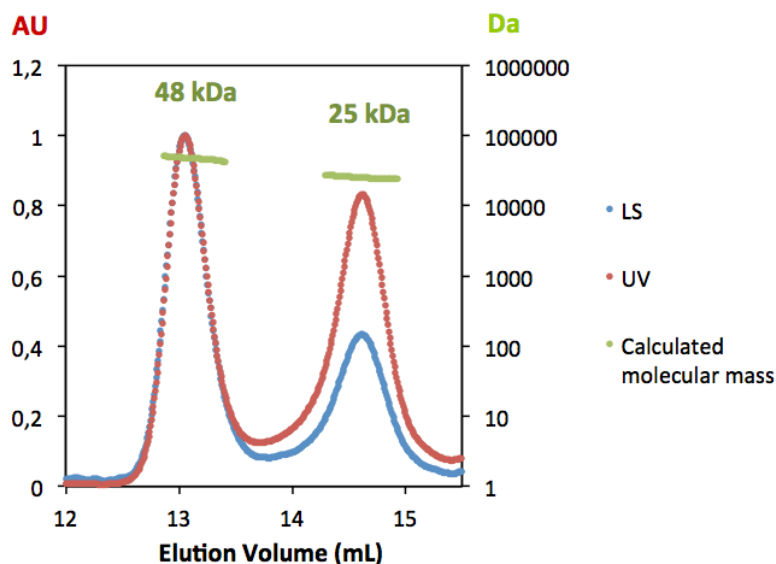


Figure 64 : Graphique correspondant à une analyse par SEC-MALS de l'émerine 1-187

Expérience de SEC-MALS réalisée sur un échantillon d'émerine 1-187 dans 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM KCl, 0.5 mM CaCl_2 , 0.1 mM ATP et 1 mM DTT sur une colonne Superdex 200 10/300GL INCREASE.

II.1.2.b. Étude des dimères d'émerine 1-187

Suite à l'observation de la présence de dimères d'émerine et étant donné la présence d'une cystéine dans la séquence de l'émerine 1-187, j'ai regardé l'impact de la quantité de réducteur (β -mercaptoéthanol) sur la formation de ces dimères (Figure 65).

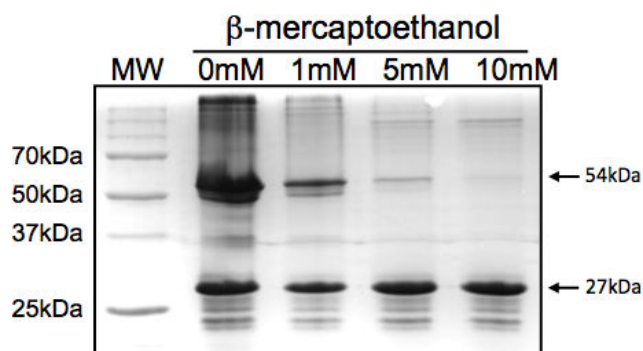


Figure 65 : Gel SDS-PAGE de l'émerine dans différentes concentrations de β -mercaptoéthanol

Un échantillon d'émerine 1-187 dans 20 mM Tris-HCl pH 8, et 30 mM NaCl a été mis en contact avec différentes concentrations de β -mercaptoéthanol (0, 1, 5 et 10 mM) et déposé sur gel SDS-PAGE non dénaturant.

Le dimère d'émerine (54 kDa) disparaît en présence de réducteur, prouvant que des ponts disulfures sont à l'origine de l'association de l'émerine en dimères. Comme l'environnement cellulaire est un environnement réducteur et que la cystéine de l'émerine est très peu conservée (Figure 66), il semble que ces dimères aient un sens biologique très limité. Ils pourraient n'être que des artéfacts de manipulation *in vitro*.

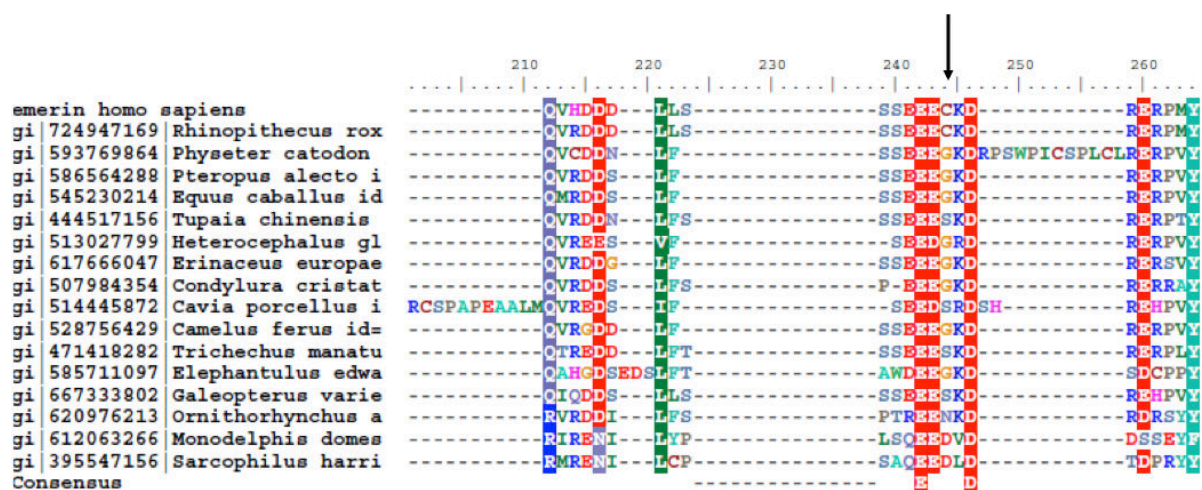


Figure 66 : La cystéine de l'émerine n'est pas conservée

Alignement des séquences de l'émerine provenant de 17 mammifères différents. Chaque séquence est identifiée par son code GenBank. La flèche noire montre la position de la cystéine présente dans la protéine humaine.

II.1.2.c. Les monomères d'émerine 1-187 forment des filaments

Je me suis ensuite intéressée aux oligomères de plus haut poids moléculaire observés par UCA. En déposant ces échantillons sur grille de microscopie électronique en présence d'acétate d'uranyle (1%), j'ai pu observer la présence particules sphériques et de filaments curvilinéaires d'environ 10 nm de diamètre (Figure 67).

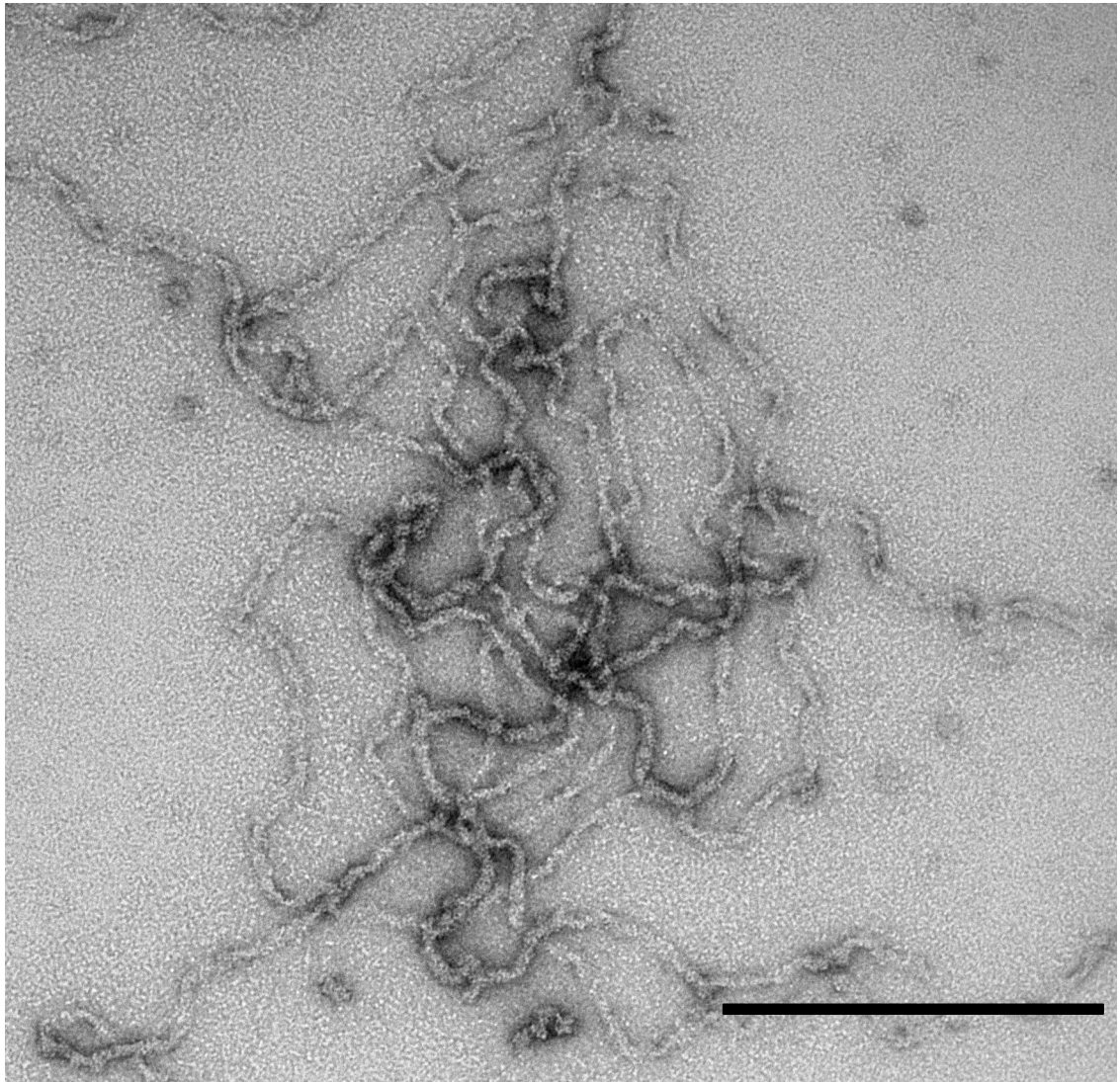


Figure 67 : Image de microscopie électronique à transmission de l'émerine

Image obtenue par le Dr Daniel Levy (équipe Microscopie Moléculaire des Membranes (MMM) à l'Institut Curie, Paris) sur un échantillon d'émerine à 35 μM dans 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl ayant été conservé plusieurs semaines à température ambiante à une concentration de 350 μM . La barre d'échelle = 200 nm.

Afin d'établir dans quelles conditions l'émerine était capable de former des filaments, j'ai testé différentes concentrations protéiques et différentes températures d'incubation (Figure 68). L'émerine est capable de former des filaments avec une cinétique dépendante de sa concentration et de la température d'incubation. Après avoir réalisé de nombreuses expériences, j'ai conclu que l'augmentation de la concentration et de la température accélérât la formation des filaments. Cependant, au dessus de 100 μM , l'émerine finit toujours, après un certain temps, par former des filaments quelle que soit la température testée (4°C, 10°C, 20°C, 37°C ou 65°C).

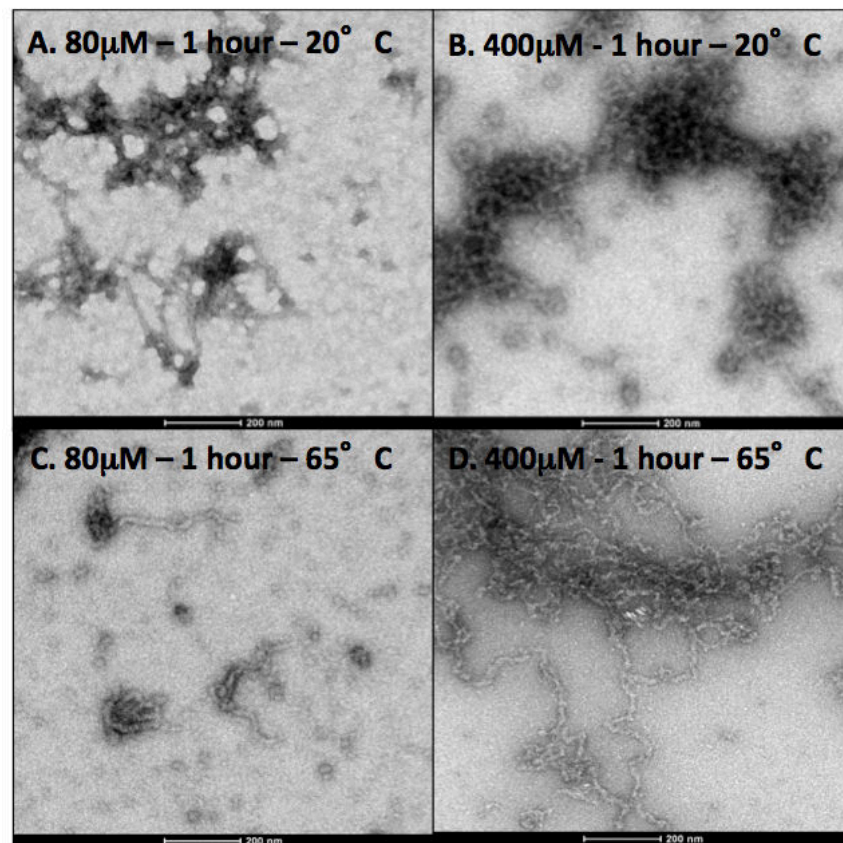


Figure 68 : L'émerine forme des filaments avec une cinétique dépendante de la température

Images de microscopie électronique à transmission réalisées par le Dr Dmytro Puchkov (Core Facility Cellular Imaging, FMP, Berlin) sur un échantillon d'émerine dialysé contre 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol. L'échantillon a ensuite été concentré à 80 ou 400 μM puis incubé 1h soit à 20°C soit à 65°C. Après 3 jours à 20°C, tous les échantillons ont été déposés sur grille de microscopie à une concentration d'environ 20 μM . Barre d'échelle = 200 nm.

La question était alors de savoir si ce sont les monomères ou les dimères d'émerine qui sont à l'origine de la formation des filaments. J'ai donc utilisé un échantillon d'émerine que j'ai incubé soit avec 10 μM de β -mercaptoéthanol soit 10 μM d' H_2O_2 et que j'ai ensuite chauffé à 65°C pendant 1h, protocole classique permettant l'apparition de filaments sur grille de microscopie (Figure 69).

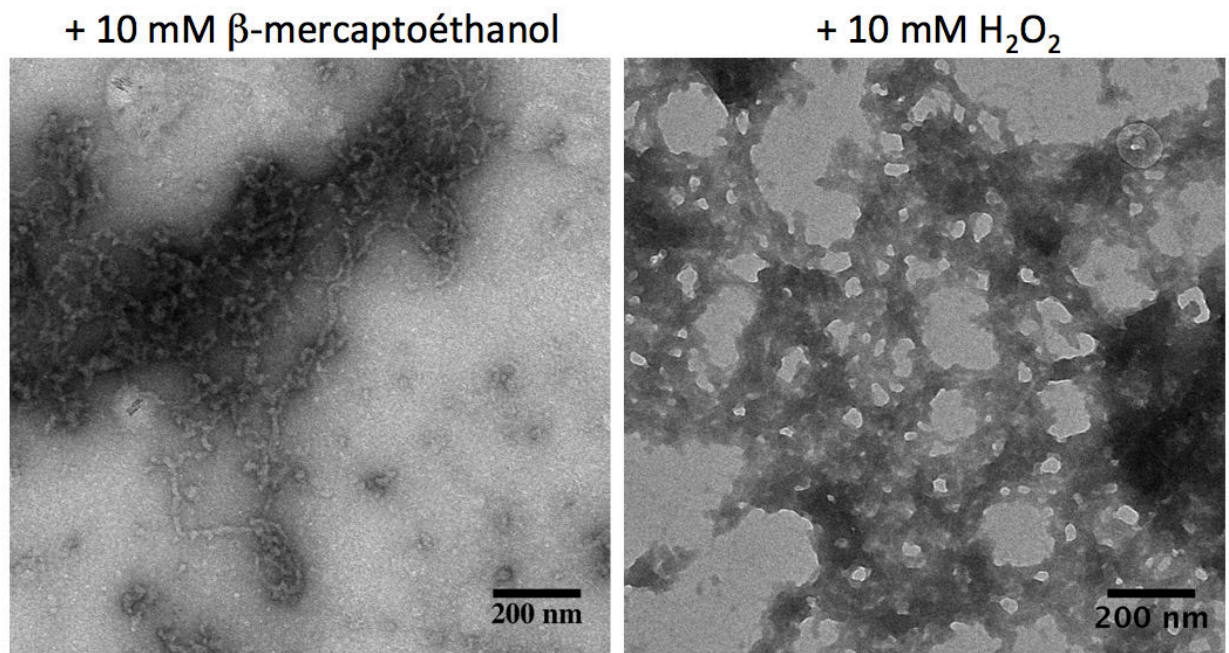


Figure 69 : Les monomères d'émerine sont à l'origine de la formation des filaments

Images de microscopie électronique à transmission que j'ai moi-même obtenu sur la plateforme d'Imagif sur un échantillon d'émerine à 370 μM dans 20 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl incubé avec soit 10 mM β -mercaptoéthanol soit 10 mM de H_2O_2 puis chauffé 1h à 65°C . Les échantillons ont été déposés à une concentration d'environ 37 μM .

J'observe la formation de filaments en milieu réducteur (β -mercaptoéthanol) mais pas en milieu oxydant (H_2O_2), dans lequel ne sont présents que des agrégats amorphes. Ceci montre que les monomères d'émerine sont à l'origine de la formation des filaments et non les dimères.

Afin d'étudier les filaments, il m'a donc semblé important de systématiquement commencer les expériences avec un échantillon contenant principalement des monomères. J'ai testé différentes conditions de dialyse ; les échantillons sortant de dialyse ont ensuite été analysés en filtration sur gel (Figure 70), afin d'obtenir à $t = 0$ uniquement ou majoritairement des monomères.

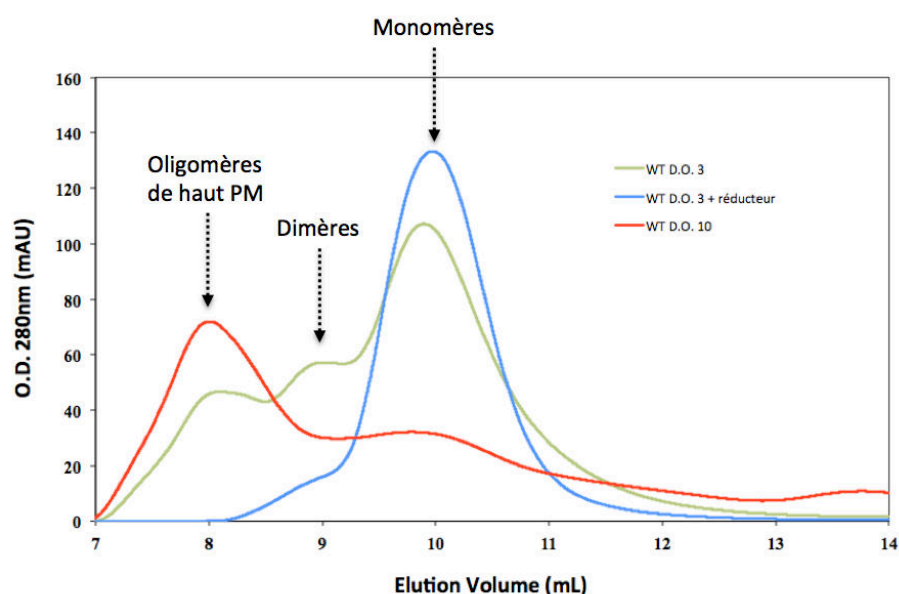


Figure 70 : Profils de purification par filtration sur gel de l'émerine dialysée dans différentes conditions

Un échantillon d'émerine a été dialysé contre 20 mM Tris-HCl, pH 8 et 30 mM NaCl soit à une D.O. de 3 (vert) soit à une D.O. de 10 (rouge) soit à une D.O. de 3 en présence de 10 mM β -mercaptoéthanol. Ces trois échantillons ont été ensuite dilués à une D.O. de 1, puis injectés directement sur une Superdex 75 10/30 équilibrée dans 20 mM Tris-HCl, pH 8 et 30 mM NaCl.

Si je compare l'aspect des boudins de dialyses des deux échantillons à 3 et 10 de D.O., j'observe beaucoup plus de précipité dans l'échantillon le plus concentré aboutissant à une perte de protéine considérable (en comparant les D.O. avant et après dialyse). L'échantillon dialysé à 3 de D.O. ne présente que peu de perte, et représente donc une concentration idéale pour la dialyse. De façon similaire, les filtrations sur gel correspondantes montrent une proportion d'espèces de plus haut poids moléculaires pour l'échantillon le plus concentré. Si je compare maintenant les deux échantillons dialysés à 3 de D.O., je remarque que l'échantillon dialysé en présence de β -mercaptoéthanol contient essentiellement des monomères, alors que l'échantillon dialysé sans β -mercaptoéthanol présente 3 différentes espèces ; monomères, dimères et oligomères de plus haut poids moléculaire. J'ai donc décidé à partir de ce moment là de dialyser mes échantillons à une D.O. de 3 en ajoutant 10 mM de β -mercaptoéthanol dans les bains de dialyse afin de n'obtenir en fin de dialyse pratiquement que des monomères.

II.1.2.d. Composition structurale des filaments d'émerine 1-187

J'ai ensuite réalisé des expériences d'ATR-FTIR (Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée). Cette technique permet de caractériser et de quantifier les structures secondaires présentes dans les échantillons testés. J'ai donc mesuré et comparé les résultats obtenus sur le même échantillon d'émerine en sortie de dialyse (monomères) et après l'avoir chauffé 1h à 65°C (filaments) (Figure 71). La présence de filaments dans l'échantillon chauffé a été vérifiée par microscopie électronique à transmission.

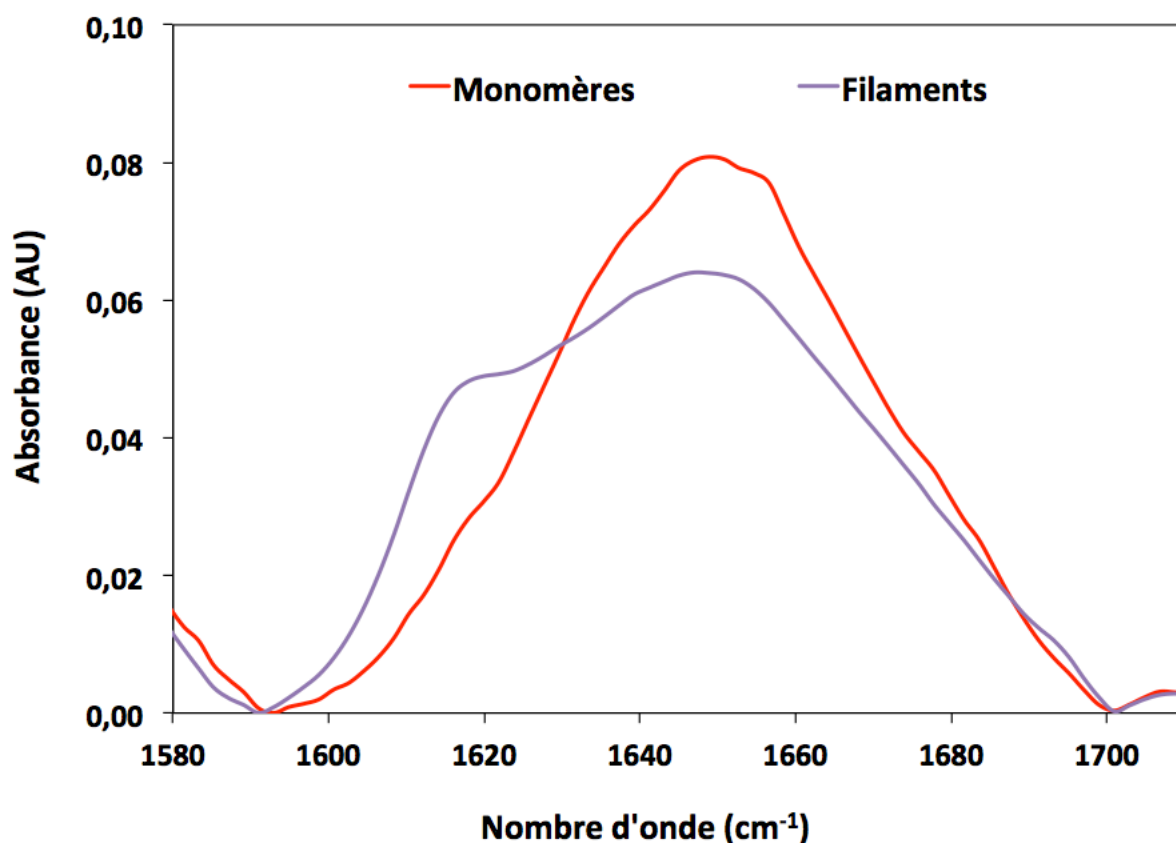


Figure 71 : Spectre ATR-FTIR de l'émerine avant et après formation des filaments

Spectres ATR-FTIR de la bande amide 1 (1600 – 1700 cm⁻¹) obtenus sur un échantillon d'émerine à 1.2 mM dans 20 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl et 10 mM β-mercaptoéthanol, en sortie de dialyse (rouge) et après l'avoir chauffé 1h à 65°C (violet).

La bande amide 1 (entre 1600 et 1700 cm⁻¹) est celle étant influencée par les différentes structures secondaires.

Afin de comparer les structures secondaires présentes dans les deux échantillons, j'ai soustrait le spectre des monomères à celui des filaments (Figure 72).

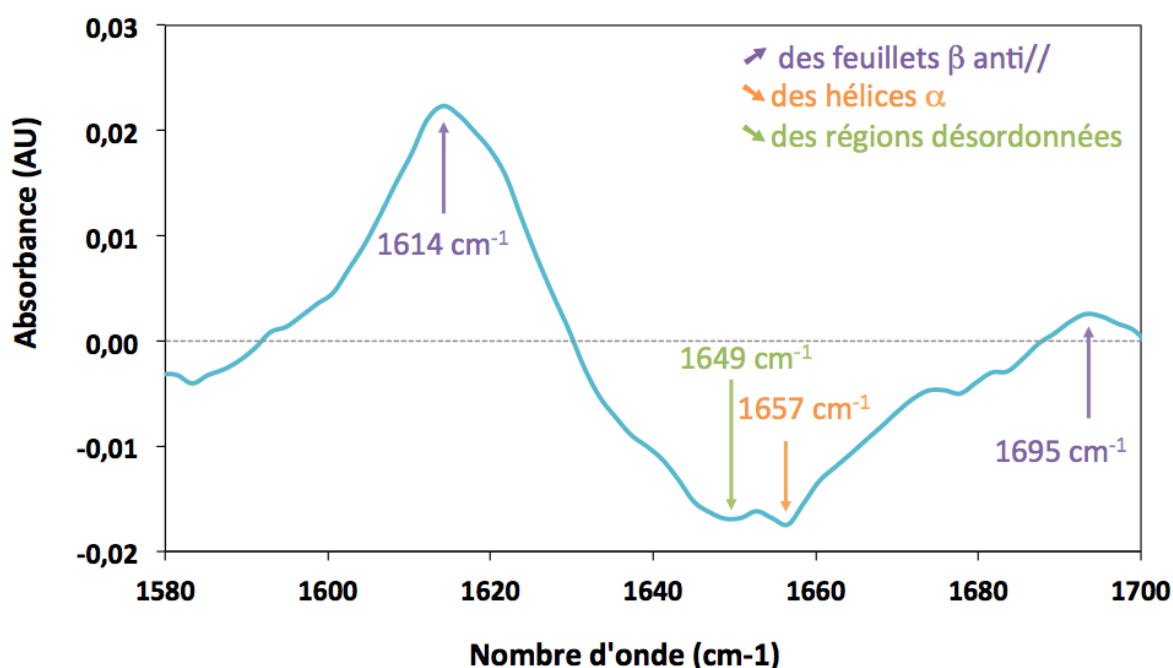


Figure 72 : Soustraction des spectres ATR-FTIR des filaments et des monomères d'émerine

La soustraction montre une augmentation de la présence de feuillet β antiparallèles (flèches violettes) et une diminution des hélices α (flèche orange) et des parties désordonnées (flèche verte) après formation des filaments.

La formation des filaments implique une diminution des hélices α (1657 cm^{-1}) et régions désordonnées (1649 cm^{-1}) au profit de l'apparition de feuillet β antiparallèles (1614 et 1695 cm^{-1}). L'émerine qui au départ est majoritairement désordonnée, va former des filaments contenant des feuillets β . La diminution du signal des hélices α semble correspondre à un dépliement du domaine LEM qui pourrait être nécessaire à la formation des filaments.

J'ai voulu aller plus loin et mesurer la cinétique de formation des filaments en faisant appel à la spectroscopie de fluorescence. La Thioflavine (ThT) est un fluorophore ayant des capacités très différentes lorsqu'il est libre ou en interaction avec des feuillets β . En effet, si l'on excite la ThT à 440 nm, elle ne donnera un signal d'émission à 480 nm qu'en présence de feuillets β . Après avoir observé l'apparition de structures β dans les filaments d'émérine par ATR-FTIR, j'ai décidé de regarder la capacité de ces filaments à lier la ThT (Figure 73).

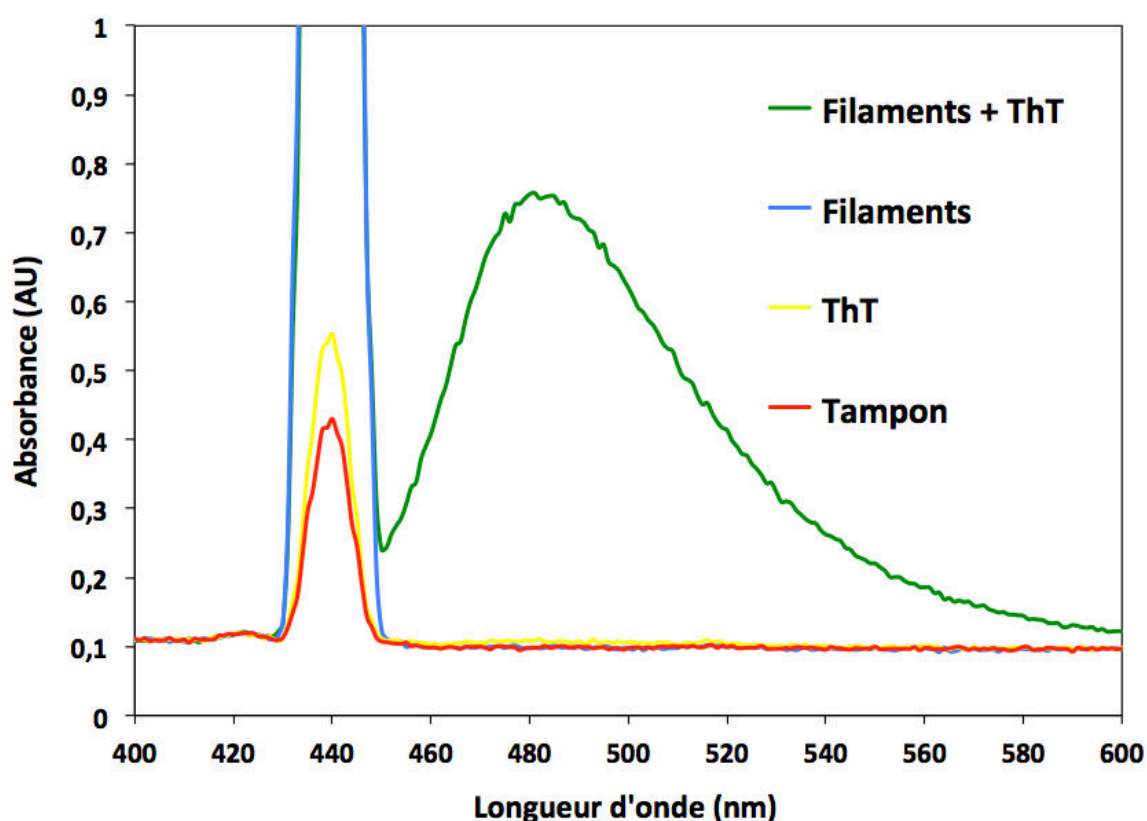


Figure 73 : Émission de fluorescence de la ThT en présence de filaments d'émérine

Spectres obtenus sur un échantillon d'émérine à 370 μ M dans 20 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol, après l'avoir chauffé 1h à 65°C (filaments). La mesure a été réalisée sur un mélange émérine (10 μ M) / ThT (10 μ M).

Après une excitation à 440 nm, j'ai mesuré l'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde. Alors que tous les contrôles sont négatifs (tampon, ThT ou filaments seuls), la ThT au contact des filaments d'émérine présente une émission de fluorescence caractéristique à 480 nm, renforçant l'idée que les filaments d'émérine contiennent des feuillets β .

La mesure de la fluorescence de la ThT permet également de suivre les cinétiques d'assemblage des filaments. L'émerine est chauffée pendant 1h à 65°C et régulièrement, un échantillon est prélevé, mis au contact de la ThT et un spectre d'émission de fluorescence est mesuré après excitation à 440 nm. La valeur obtenue sur le spectre d'émission à 480 nm est ensuite reportée sur un graphique en fonction du temps de mesure (Figure 74).

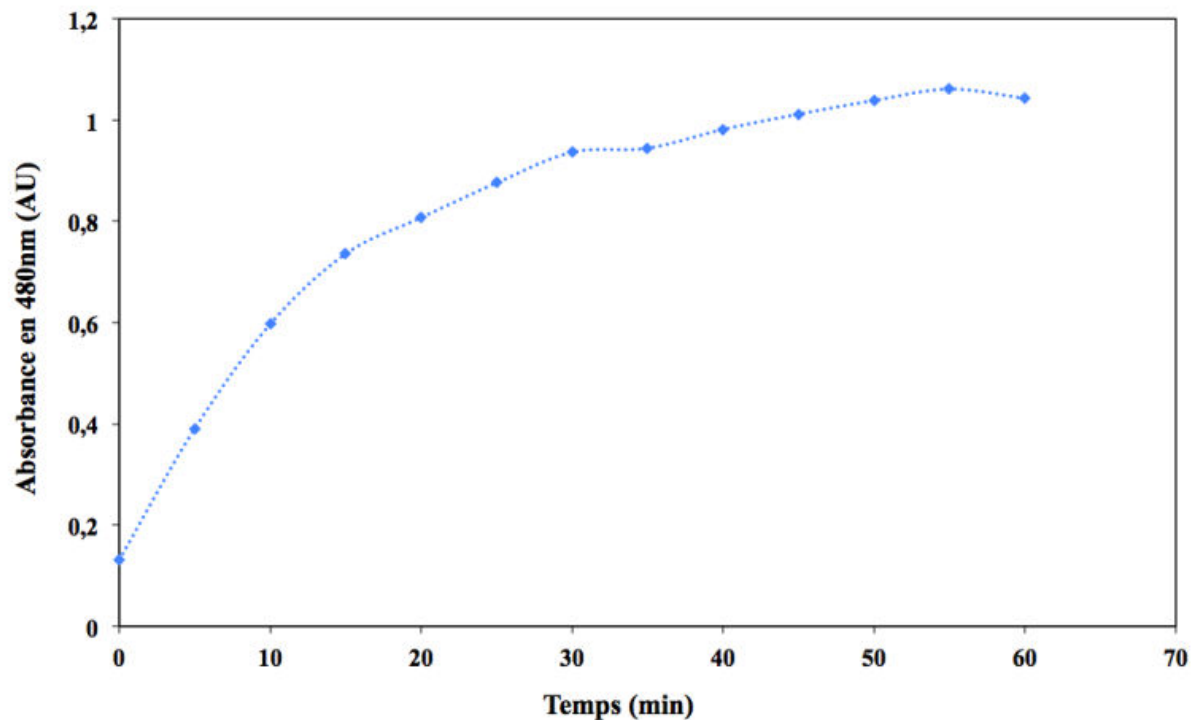


Figure 74 : Cinétique de formation des filaments d'émerine à 65°C suivie par fluorescence de la ThT

Spectre obtenu sur un échantillon d'émerine à 370 μM dans 20 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol. L'échantillon est chauffé à 65°C pendant 1h et des mesures sont faites toutes les 5 minutes en prélevant un peu d'échantillon et en le diluant (40 μM final) dans une solution de ThT (10 μM final).

II.1.2.e. Attribution des résidus de l'émerine 1-187 impliqués dans la formation des filaments

RMN du solide

Afin d'identifier les résidus impliqués dans la formation des filaments, un échantillon d'émerine 1-187 a été purifié, dialysé dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol, concentré jusqu'à 1.12 mM, chauffé 1h à 65°C et analysé par RMN du solide par le groupe du Prof. Adam Lange au FMP Berlin. Un spectre RMN de corrélations dipolaires C-C avec un mélange de type SPC5 a été enregistré sur l'échantillon et a permis d'observer des corrélations dans l'espace entre les différents carbones des chaînes latérales des résidus complètement rigides (localisés dans les filaments). Une attribution préliminaire de chacun des signaux à un type de résidu et basée sur l'analyse des déplacements chimiques carbone des corrélations, est représentée sur le spectre (Figure 75). Un spectre identique a été obtenu sur un échantillon d'émerine purifié de la même manière mais dialysé avec plus de NaCl (150 mM) et concentré jusqu'à 600 μ M. Cet échantillon n'a pas été chauffé mais a été conservé à 10°C pendant 24 heures puis environ 3 mois à 4°C.

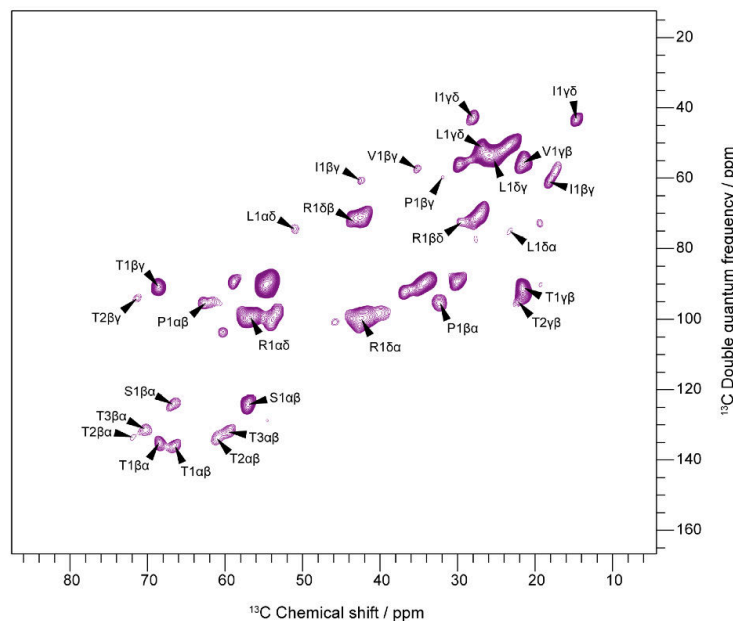


Figure 75 : Spectre obtenu sur les filaments d'émerine par RMN du solide

Spectre de corrélation double quantum-simple quantum obtenu à 800 MHz et 278K en utilisant une vitesse de rotation à l'angle magique de 8 kHz sur un échantillon de filaments d'émerine à 1.12 mM.

Des expériences complémentaires sont en cours afin d'attribuer ces signaux à une ou plusieurs séquences de l'émerine 1-187.

Spectrométrie de masse

En parallèle, je souhaiterais déterminer le ou les fragments nécessaires et suffisants pour la formation de filaments par spectrométrie de masse. Pour ce faire, j'ai réalisé (étude toujours en cours) des expériences de protéolyse ménagée directement sur les filaments, afin de ne couper que les parties de la protéine qui ne sont pas impliquées dans la formation de ces filaments. Les fragments obtenus seront soit directement analysés par spectrométrie de masse et comparés aux fragments obtenus dans les mêmes conditions sur l'émérine monomérique, soit séparés (les filaments étant de taille conséquente, une centrifugation sur Amicon permettra d'éliminer les fragments non intéressants qui seront passés au travers de la membrane) puis analysés (Figure 76).

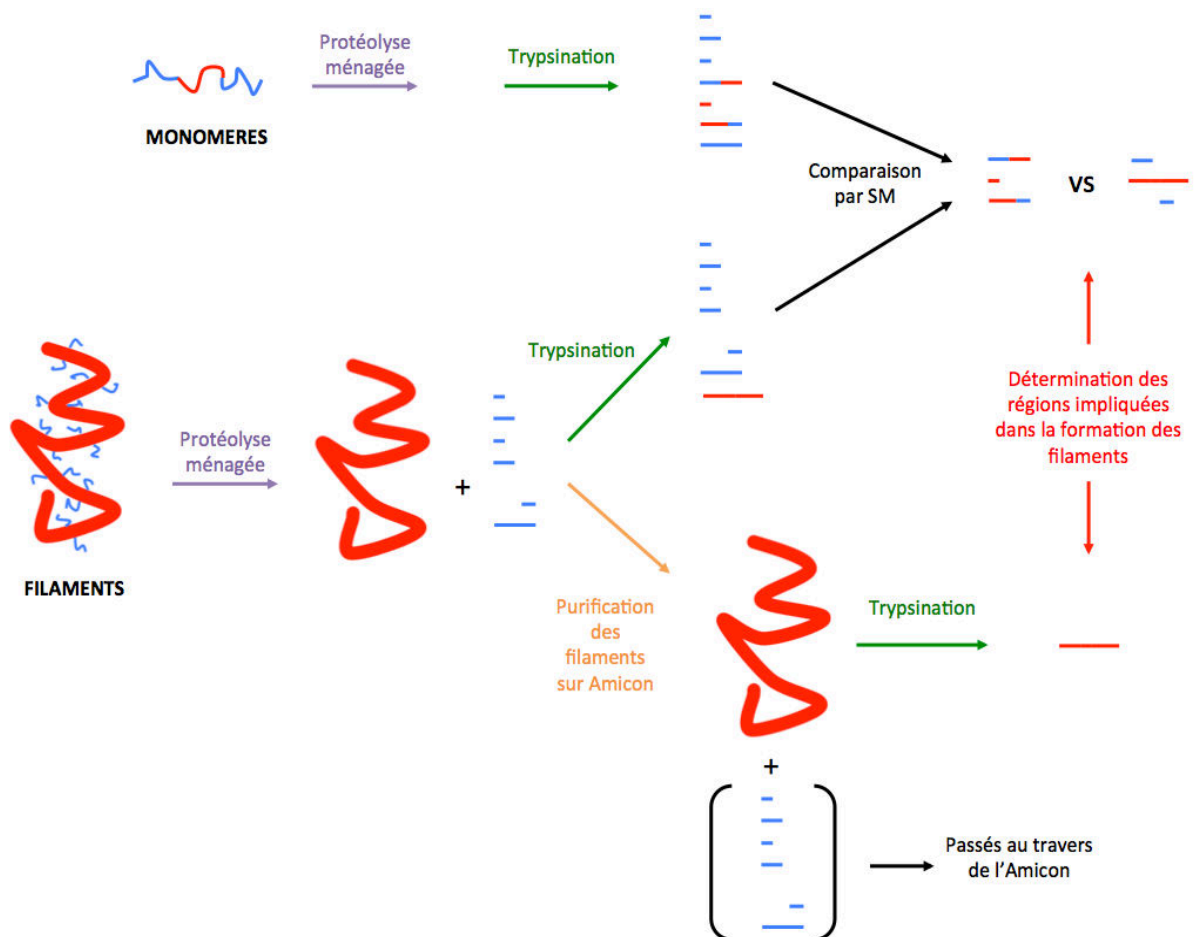


Figure 76 : Approches de protéolyse ménagée envisagées

Protéolyse ménagée et spectrométrie de masse envisagées afin de déterminer les résidus de l'émérine impliqués dans la formation des filaments.

J'ai obtenu des résultats préliminaires sur l'émerine en filaments, digérée par la trypsine (19 sites) et la chymotrypsine (22 sites). Plusieurs ratios Protéase : Filaments ont été testés : 1:10, 1:100, 1:1000 et 1:10000. Ces mélanges ont été incubés à 37°C pendant 1h et des échantillons ont été prélevés au fur et à mesure. L'arrêt de la digestion a été réalisé en ajoutant directement le tampon de charge des gels SDS-PAGE (Laemli) directement sur les échantillons. Les gels obtenus pour les ratios 1 :1000 sont présentés sur la [Figure 77](#). J'observe pour les deux conditions une bande intense aux alentours de 12 kDa qui persiste avec le temps. Elle pourrait correspondre au(x) fragment(s) impliqué(s) dans la formation des filaments. Des essais supplémentaires seront nécessaires pour obtenir les conditions idéales de protéolyse (température, ratio Protéase : Protéine, temps d'incubation) avant d'analyser les échantillons par spectrométrie de masse.

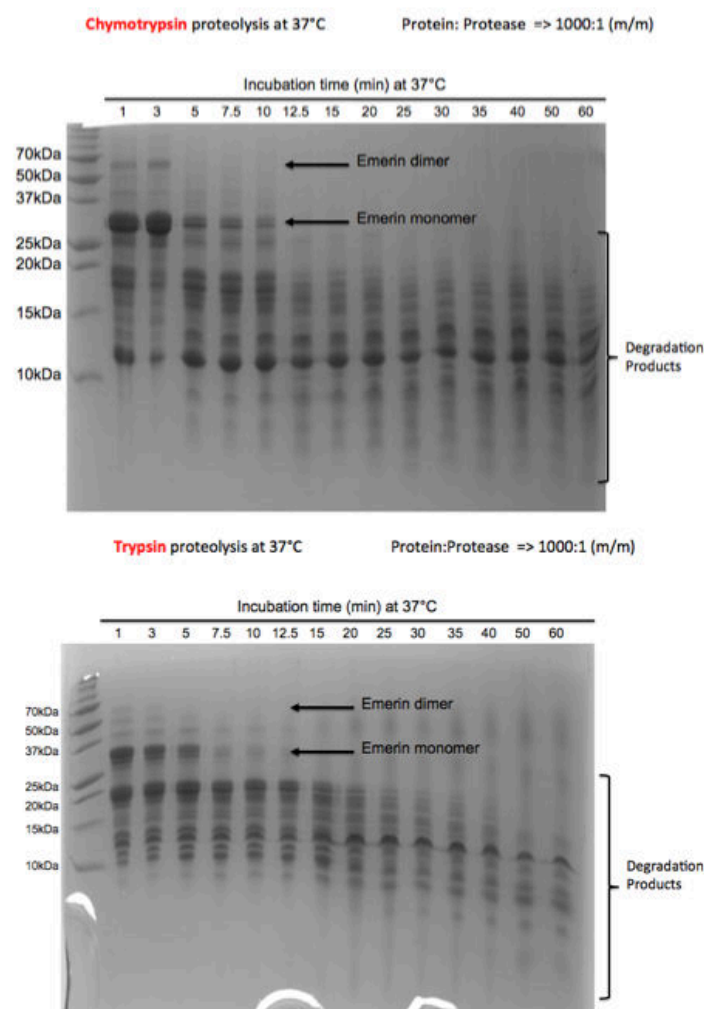


Figure 77 : Gels SDS-PAGE de la protéolyse ménagée des filaments de l'émerine

II.1.3. L'émerine semble interagir avec elle-même *in vivo*

Nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Brigitte Buendia à l'université Paris Diderot, ont regardé les proximités émerine - émerine dans la cellule grâce à des expériences d'immunofluorescence (Figure 78) et de PLA (Proximity Ligation Assay) (Figure 79).

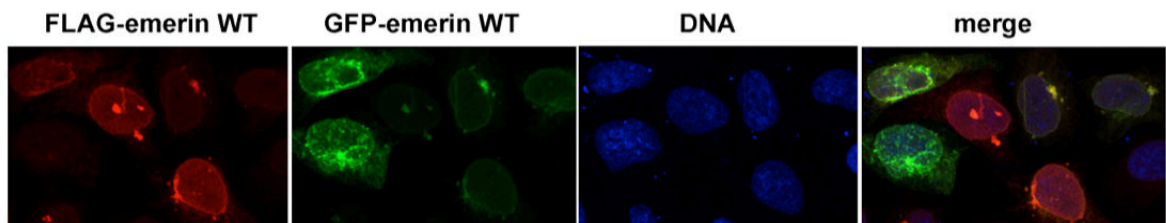


Figure 78 : Immunofluorescence de l'émerine dans des cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2 plasmides différents, 1 codant pour GFP-émerine, l'autre codant pour FLAG-émerine. La détection se fait d'abord par ajout d'anticorps primaires (anticorps de souris anti-GFP et anticorps de lapin anti-FLAG) puis par des anticorps secondaires couplés à des fluorophores (anticorps d'âne anti souris couplés au Cy2 en vert et des anticorps d'âne anti-lapin couplés au Cy3 en rouge).

Ils ont ainsi pu observer par immunofluorescence, une colocalisation de GFP-émerine et FLAG-émerine dans les cellules HeLa.

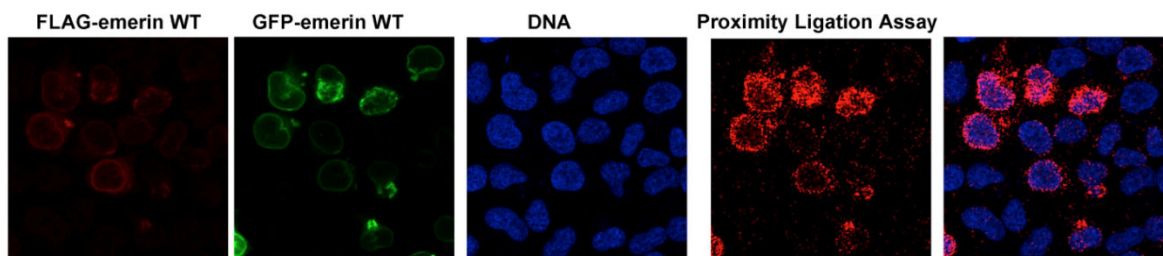


Figure 79 : PLA de l'émerine dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2 plasmides différents, 1 codant pour GFP-émerine, l'autre codant pour FLAG-émerine. La détection se fait d'abord par ajout d'anticorps primaires (anticorps de souris anti-GFP et anticorps de lapin anti-FLAG) puis par des anticorps secondaires Duolink couplés à des oligonucléotides (PLA probe anti-mouse minus et PLA probe anti-rabbit plus). Les réactifs de détection Duolink sont ensuite ajoutés, permettant d'observer un point rouge chaque fois que les 2 anticorps secondaires plus et moins sont proches dans l'espace.

Le PLA montre également des proximités spatiales entre GFP-émerine et FLAG-émerine principalement dans le noyau et particulièrement enrichies au niveau de la périphérie nucléaire. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* suggérant une capacité de l'émerine à interagir avec elle-même, et donc à s'auto-associer. Dans la cellule, l'émerine entière est observée. Comme elle se trouve ancrée à l'enveloppe nucléaire, sa probabilité de former un complexe est plus grande que lorsqu'elle est soluble dans un tube (à concentration égale). Donc le processus d'interaction observé *in vitro* doit être favorisé en cellules.

II.2. ETUDE DES PHOSPHORYLATIONS DE L'ÉMERINE

II.2.1. Phosphorylation de l'émerine *in vitro*

L'identification sur l'émerine des modifications post-traductionnelles biologiquement pertinentes, les mesures de cinétiques d'apparition de ces modifications et la compréhension des interdépendances entre les différentes modifications sont difficiles à obtenir juste à partir d'expériences de spectrométrie de masse. De plus, très peu de données existent sur l'impact de ces modifications sur l'état oligomérique de l'émerine et sur ses interactions avec ses partenaires. Les O-GlcNAcétylations ont été montrées comme pouvant prévenir l'agrégation ainsi que l'oligomérisation de protéines dans la cellule ¹⁹⁷. L'émerine possède 7 sérines montrées comme subissant cette modification post-traductionnelle, ce qui pourrait réguler la capacité de l'émerine à oligomériser / s'agréger. Il serait intéressant d'étudier l'impact de ces modifications sur les propriétés d'auto-association de l'émerine. Mais dans un premier temps, j'ai décidé de caractériser, *in vitro* et en extraits cellulaires, les phosphorylations de l'émerine. Afin de :

- Identifier les kinases impliquées dans les phosphorylations de l'émerine. Plusieurs d'entre elles ont été proposées comme phosphorylant l'émerine : Src, Abl et Her2 ; PKA ; ERK2/MAPK et GSK3 β .
- Comparer la position des résidus modifiés par rapport aux résidus mutés dans les envelopathies et potentiellement regarder l'impact de mutations causant l'X-EDMD sur la capacité de l'émerine à être phosphorylée.
- Déterminer les cinétiques de phosphorylations de l'émerine *in vitro* et dans des extraits cellulaires asynchrones ou bloqués dans une étape spécifique du cycle cellulaire (Arrêt en phase G2/M par le Nocodazole, en phase S avec la Thymidine ou en G1/S avec l'Hydrea par exemple).
- Observer les conséquences des phosphorylations sur l'état oligomérique de l'émerine et sur les interactions protéine-protéine à l'enveloppe nucléaire (en particulier l'interaction émerine-BAF, connue pour être régulée par les phosphorylations).

J'ai pu réaliser des essais préliminaires de phosphorylation de l'émerine *in vitro* par RMN dans le laboratoire du Dr Philipp Selenko au FMP à Berlin dans le cadre d'un projet BioNMR. J'ai ainsi testé différentes kinases :

- Src, une tyrosine kinase montrée comme phosphorylant l'émerine en réponse à un stress mécanique ¹⁵² et prédite comme phosphorylant différents résidus de l'émerine (Figure 80).
- ck1, une sérine/thréonine kinase prédite comme phosphorylant l'émerine sur différents résidus (Figure 80).
- ck2, suivi de gsk3 β , deux sérine/thréonine kinases dont certains sites de phosphorylations sont prédits dans la séquence de l'émerine (Figure 80).

Résidu	Src	CK1	CK2	GSK3
S8		0,735272	0,938549	
S29				0,830636
Y34	0,508099			
S60		0,727869		
S62				0,936936
S66		0,750543		0,809616
S120		0,886429		
S123		0,871596	0,856354	
S141			0,975522	
S142			0,98743	
S143			0,945899	
Y155	0,51113			
Y161	0,518082			
S173				0,939604
S175			0,898313	0,858254

Figure 80 : Prédiction de phosphorylation de l'émerine par KinasePhos2 ²¹⁴

Les prédictions de phosphorylation par les 4 kinases étudiées (Src, ck1, ck2 et gsk3 β) ont été réalisées grâce au logiciel KinasePhos2. Dans ce tableau sont représentées, pour chaque résidu prédit comme phosphorylé, les probabilités de phosphorylation par chaque kinase. Les valeurs proches de 1 représentent les plus grandes probabilités. Ont été représentés uniquement les meilleurs résultats (3 pour Src, 5 pour ck1, 6 pour ck2 et 5 pour gsk3 β).

Dans les sous-chapitres suivants, je présenterai les résultats RMN obtenus et une brève conclusion pour chaque expérience. N'ayant pas encore l'attribution du spectre de l'émerine, je ne peux malheureusement pas conclure sur l'identification des résidus phosphorylés.

II.2.1.a. Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par Src

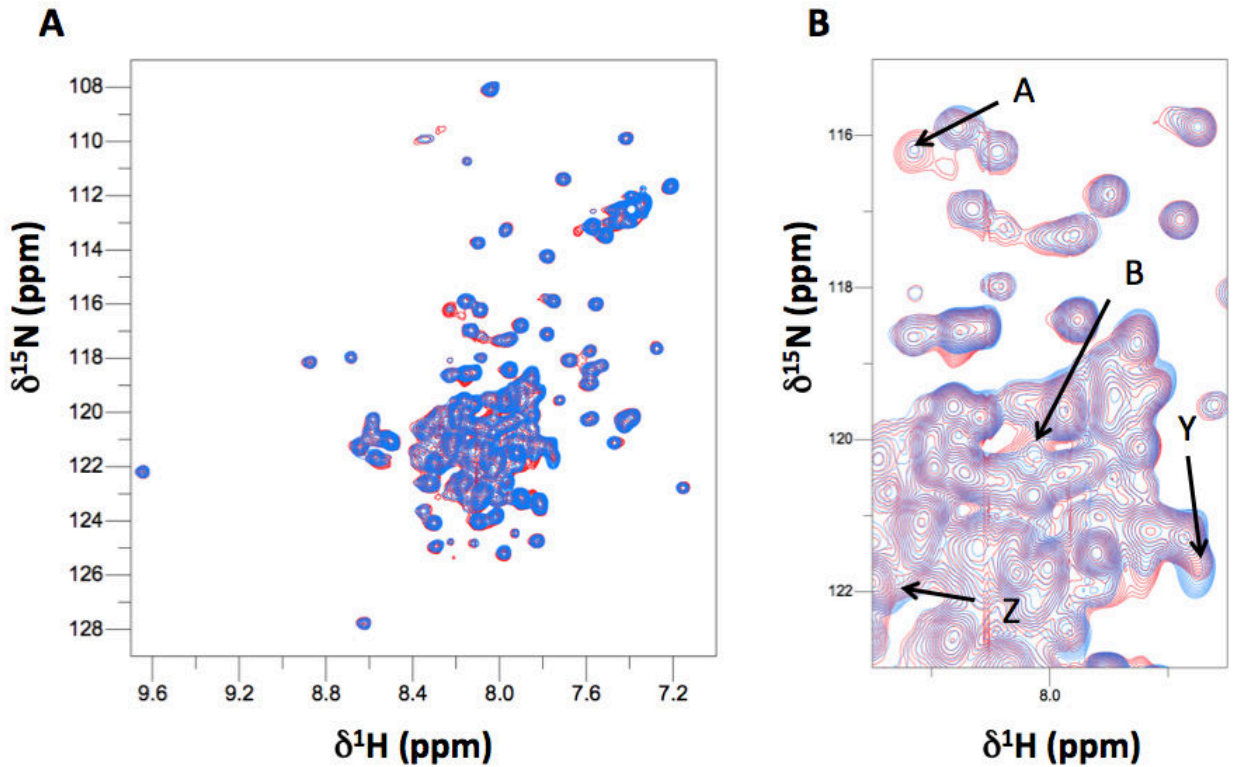


Figure 81 : Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par Src

A. Phosphorylations suivies par l'acquisition d' ^1H - ^{15}N HSQC successives de 1h, sur un échantillon d'émerine à 100 μM dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.65, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, et 10 μL de Src (500 unités). Échantillon avant phosphorylation (bleu) et après phosphorylation (rouge). **B.** Zoom de A.

2 pics apparaissent de façon significative : A ($\delta^1\text{H} = 8.23 \text{ ppm}$; $\delta^{15}\text{N} = 116.2 \text{ ppm}$) et B ($\delta^1\text{H} = 8.03 \text{ ppm}$; $\delta^{15}\text{N} = 120.3 \text{ ppm}$) et deux pics semblent disparaître après phosphorylation : Y ($\delta^1\text{H} = 7.75 \text{ ppm}$; $\delta^{15}\text{N} = 121.8 \text{ ppm}$) et Z ($\delta^1\text{H} = 8.27 \text{ ppm}$; $\delta^{15}\text{N} = 122.0 \text{ ppm}$), pics ayant des corrélations N- H_N pouvant bien correspondre à des tyrosines ($\delta^1\text{H}$ théorique \Rightarrow entre 7.38 ppm et 9.34 ppm ; $\delta^{15}\text{N}$ théorique = 122 ppm).

II.2.1.b. Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par ck1

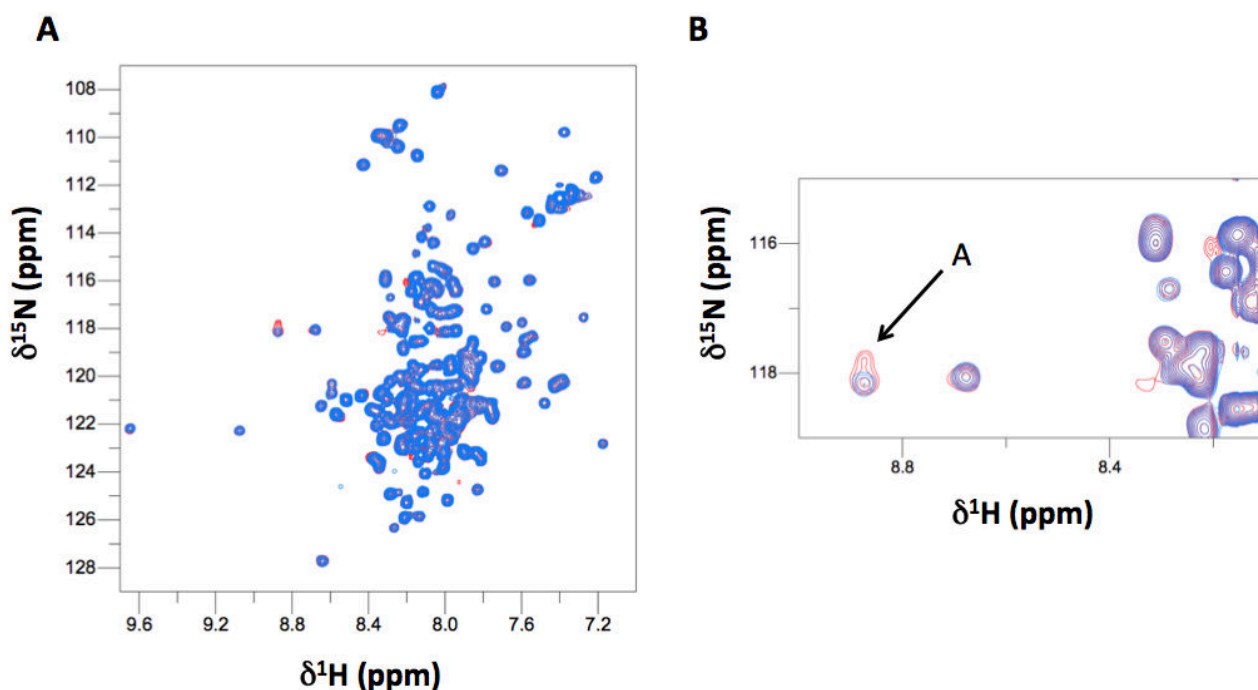


Figure 82 : Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par ck1

A. Phosphorylations suivies par l'acquisition d' ^1H - ^{15}N HSQC successives de 1h, sur un échantillon d'émerine à 100 μM dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.65, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, et 1 μL de ck1 (1000 unités). Échantillon avant phosphorylation (bleu) et après phosphorylation (rouge). **B.** Zoom de **A**.

Le spectre ne présente pas de changement évident après phosphorylation par ck1. Seul 1 pic semble apparaître ($\delta^1\text{H} = 8.88$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 118$ ppm) mais il est de très faible intensité. Si ck1 est capable de phosphoryler l'émerine, ce n'est que sur très peu de résidus. La sérine de l'émerine prédite par KinasPhos2 comme phosphorylée par ck1 avec le plus grand indice de confiance est la sérine 120.

Par ailleurs, l'équipe du Dr Philipp Selenko a publié un article sur la capacité de ck1 à phosphoryler une sérine positionnée 4 résidus en aval d'une tyrosine phosphorylée. Cette séquence YXXXXS est présente à 6 reprises dans ma construction d'émerine ; 3 d'entre elles ont leur tyrosine prédite par KinasPhos comme phosphorylée par Src (en positions 155-159, 181-185 et 182-186) et une 4^{ème}, correspondant aux résidus 94-98 contient la tyrosine montrée phosphorylée par Src après stress mécanique. On pourrait donc imaginer de suivre les phosphorylations de l'émerine par ck1 après l'avoir phosphorylée par Src.

II.2.1.c. Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par ck2

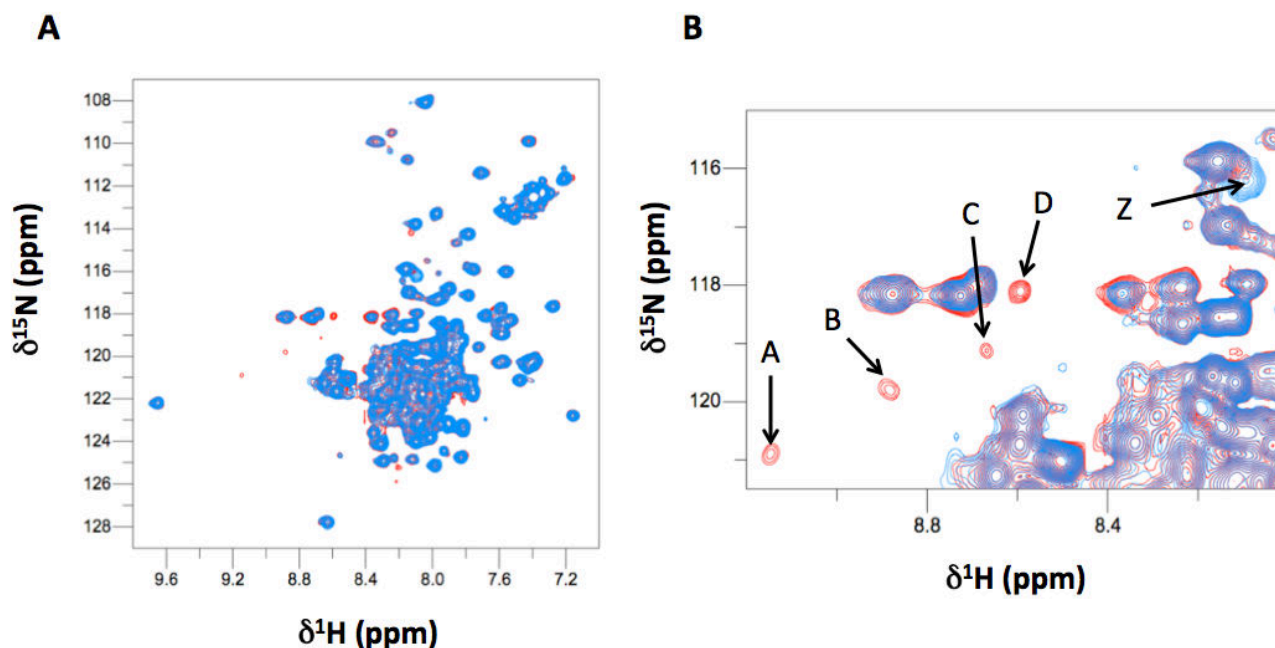


Figure 83 : Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par ck2

A. Phosphorylations suivies par l'acquisition d' ^1H - ^{15}N HSQC successives de 1h, sur un échantillon d'émerine à 100 μM dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.65, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, et 1 μL de ck2 (500 unités). Échantillon avant phosphorylation (bleu) et après phosphorylation (rouge). **B.** Zoom de **A**.

4 pics apparaissent sur le spectre de la protéine phosphorylée par ck2 : A ($\delta^1\text{H} = 9.13$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 120.9$ ppm), B ($\delta^1\text{H} = 8.87$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 119.7$ ppm), C ($\delta^1\text{H} = 8.68$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 119.2$ ppm) et D ($\delta^1\text{H} = 8.60$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 118.2$ ppm). Les sérines prédites par KinasPhos2 comme phosphorylées par ck2 avec la plus grande probabilité sont S8, S123, S175 et les trois sérines consécutives S141, S142 et S143 qui si elles sont phosphorylées aboutiraient à 1 seul pic sur l'HSQC. 1 seul pic semble cependant disparaître après phosphorylation Z ($\delta^1\text{H} = 8.10$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 116.3$ ppm). Le problème vient probablement du fait que peu de sérines/thréonines sont visibles sur le spectre non phosphorylé à cause du pH. A pH 7.65, pH idéal pour les kinases, les protons des sérines ont tendance à s'échanger avec les protons du solvant, rendant ces résidus très difficiles à observer.

II.2.1.d. Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par gsk3 β après phosphorylation par ck2

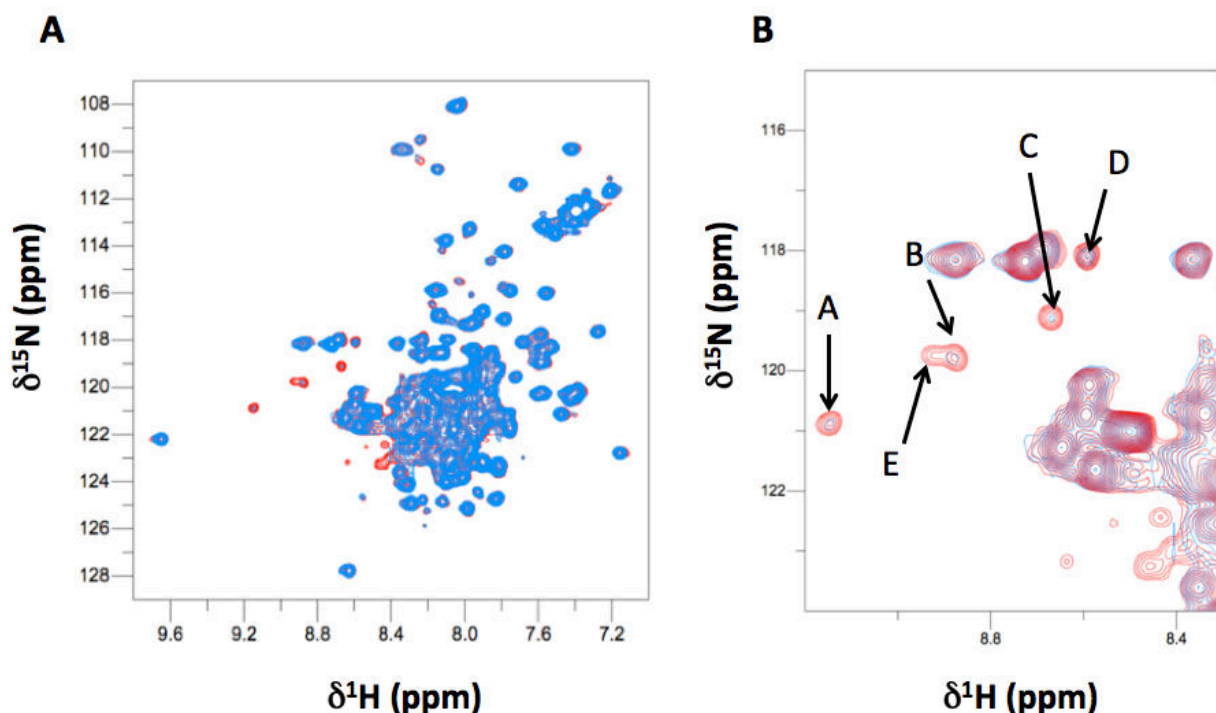


Figure 84 : Phosphorylation *in vitro* de l'émerine par gsk3 β après phosphorylation par ck2

A. Phosphorylations suivies par l'acquisition d' ^1H - ^{15}N HSQC successives de 1h, sur un échantillon d'émerine à 100 μM déjà phosphorylé par ck2 dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.65, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP auquel ont été ajoutés 1 μL de gsk3 β (500 unités). Échantillon avant phosphorylation (bleu) et après phosphorylation (rouge). **B.** Zoom de **A**.

Après phosphorylation par gsk3 β , j'observe une augmentation de l'intensité des pics déjà présents sur le spectre après phosphorylation par ck2 (A, B, C et D). Ce phénomène correspond probablement à la suite de la cinétique de phosphorylation par ck2, encore présente dans l'échantillon. 1 nouveau pic apparaît cependant E ($\delta^1\text{H} = 8.91$ ppm ; $\delta^{15}\text{N} = 119.8$ ppm) et pourrait correspondre à la sérine 173, prédite par KinasePhos2 comme phosphorylée par gsk3 β avec le meilleur indice de confiance.

II.2.2. Phosphorylation de l'émerine en extraits cellulaires

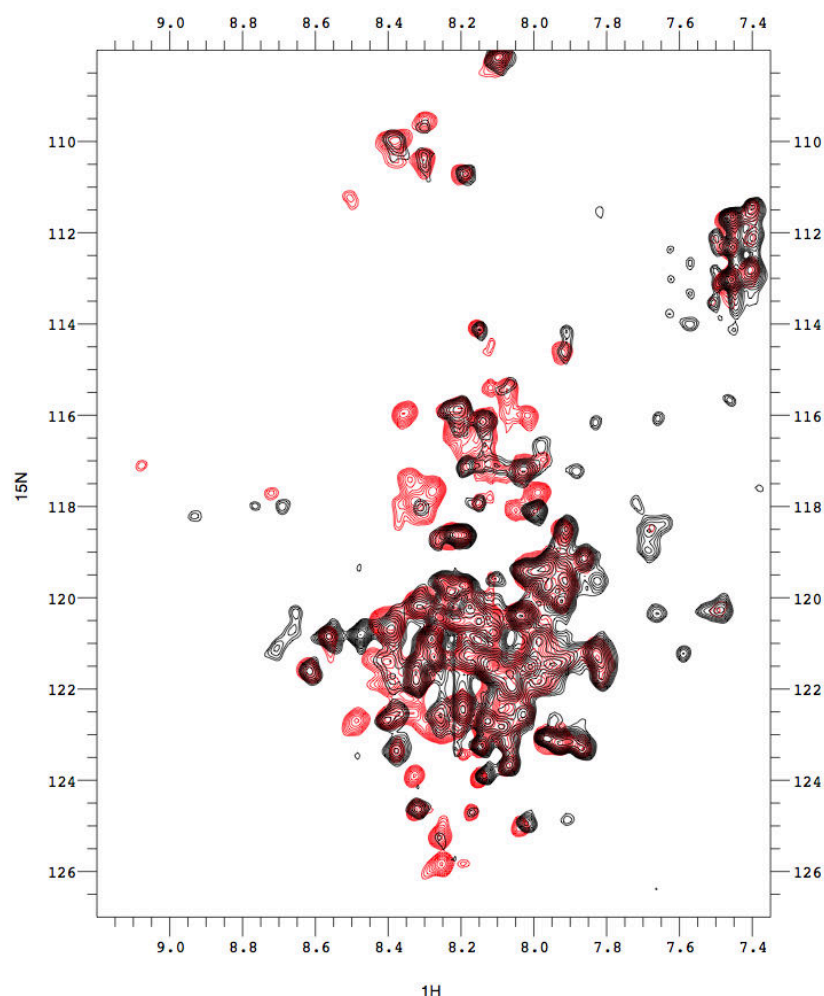


Figure 85 : Essai de phosphorylation de l'émerine en extraits cellulaires

Phosphorylations suivies par l'acquisition d' ^1H - ^{15}N HSQC successives de 1h, sur un échantillon d'émerine à 50 μM dans 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM TCEP, 15 mM ATP auquel ont été ajoutés 175 μL d'extraits cellulaires de cellules HeLa à 15 mg/mL. Échantillon avant phosphorylation (noir) et après phosphorylation (rouge).

J'ai également réalisé des expériences de phosphorylation de l'émerine en extraits cellulaires par RMN sur des extraits de cellules HeLa (Figure 85). La difficulté à analyser ces spectres réside dans le fait que les changements entre avant et après incubation dans les extraits sont trop importants. J'observe une disparition des signaux correspondant aux résidus structurés de l'émerine (domaine LEM) qui pourraient éventuellement interagir avec de nombreux partenaires dans les extraits. J'observe également une apparition de signaux dans la région des résidus déstructurés (δ ^1H : 7.8 – 8.4 ppm).

Étant donné que le pH n'a pas changé, cette apparition de signaux pourrait être due à un dépliement du domaine LEM suite à un changement d'état oligomérique de la protéine (formation de filaments), comme observé dans l'analyse ATR-FTIR de l'émerine (p. 108).

Il est donc très difficile de suivre les modifications post-traductionnelles en extraits cellulaires d'une protéine possédant de nombreux partenaires et dont l'état oligomérique est très sensible aux conditions. On peut imaginer que l'encombrement dû aux protéines présentes dans les extraits ait une influence sur l'état oligomérique de l'émerine.

Deux possibilités pourraient permettre d'étudier les modifications post-traductionnelles de l'émerine en extraits :

Je pourrais incuber l'émerine dans des extraits cellulaires, purifier de nouveau l'émerine et réaliser son spectre HSQC. Je perdrais les informations sur la cinétique de modification, mais je pourrais déterminer les pics de l'HSQC correspondants aux résidus modifiés.

Une seconde option serait de réaliser 2 expériences en parallèle, sur le même échantillon d'émerine et le même échantillon d'extraits cellulaires. En mélangeant l'émerine et les extraits cellulaires et en ajoutant ou non des inhibiteurs de kinases. Dans le cas où je n'ajoute pas les inhibiteurs de kinases, je m'attends à observer les mêmes résultats qu'en [Figure 85](#). Dans le cas où j'ajoute des inhibiteurs de kinases, j'observerais tous les changements correspondants aux interactions avec des partenaires potentiels et à l'effet de l'environnement mais aucune phosphorylation. De ce fait, en comparant les deux spectres obtenus je pourrais déterminer quels sont les changements uniquement dus aux phosphorylations de l'émerine.

À partir de là, on pourrait imaginer de tester ces protocoles sur des extraits :

- Issus de différents types cellulaires (cellules musculaires par exemple)
- Synchronisés dans une phase spécifique du cycle, afin de déterminer pour chaque modification, si elle est dépendante ou non du cycle cellulaire
- Nucléaires, en séparant les noyaux des cellules juste avant la lyse, je n'observerais que les phosphorylations spécifiques des kinases nucléaires
- Provenant de n'importe quelle combinaison des 3 propositions précédentes

II.3. ETUDE DES VARIANTS DE L'ÉMERINE CAUSANT UNE EDMD

II.3.1. Caractérisation de l'impact de 5 mutations causant l'X-EDMD sur les propriétés d'assemblage de l'émerine

J'ai utilisé ma construction d'émerine 1-187 afin d'insérer les cinq mutations causant l'X-EDMD qui m'intéressent : S54F, Q133H, P183H, P183T et Del95-99. Les mutations ont été réalisées grâce à un kit de mutagenèse dirigée (Stratagène QuikChange) et les gènes obtenus ont été séquencés afin de vérifier l'insertion des mutations. J'ai eu des difficultés à obtenir le mutant P183H, et ce n'est que plus tardivement que j'ai réussi à l'obtenir en modifiant les séquences des primers utilisés et les conditions de PCR (température, nombre de cycles, présence de DMSO). Certaines expériences ne comportent donc pas ce mutant P183H.

Des tests d'expression ont d'abord été réalisés sur ces mutants afin de trouver les meilleures conditions de culture et de comparer l'expression de ces mutants par rapport au WT (Figure 86). Tous les mutants présentent le même comportement que le WT, c'est à dire une expression quasi totale dans les corps d'inclusions (puits notés C). Le mutant Del95-99 est quant à lui légèrement différent. Son expression est beaucoup plus faible avec un ratio soluble/corps d'inclusion allant de 20 à 50%.

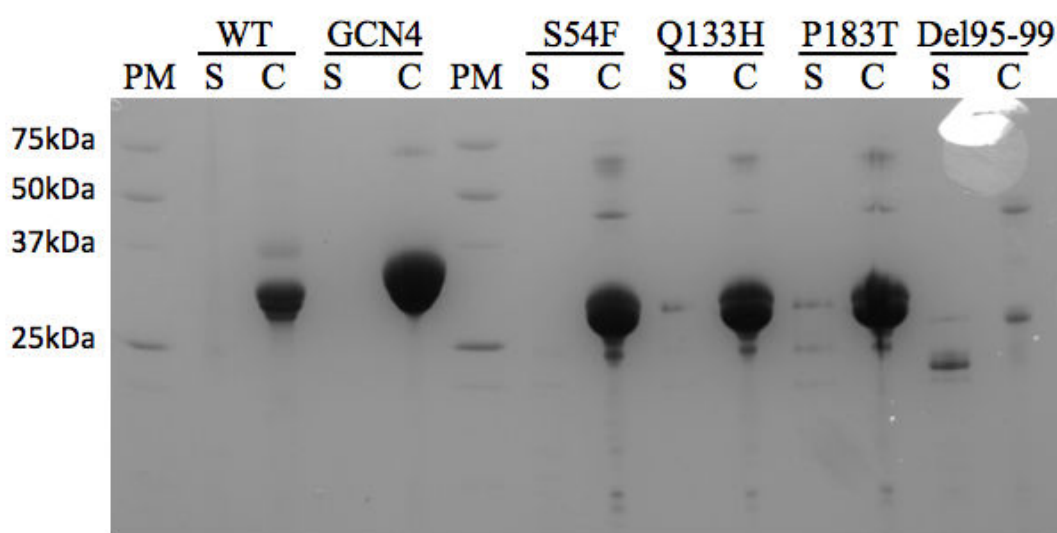


Figure 86 : Expression et solubilité des mutants de l'émerine 1-187 portant les mutations causant l'X-EDMD

Les mutants de l'X-EDMD (S54F, Q133H, P183T et Del95-99) ont été exprimés dans *E. coli* en suivant le même protocole que pour le WT (émerine 1-187). Après une lyse classique, les surnageants et culots (S et C) ont été déposés sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes (réductrices).

J'ai dialysé tous les mutants dans des conditions réductrices et réalisé des filtrations sur gel afin de déterminer les espèces présentes dans nos échantillons à temps 0 (Figure 87) et après 24h à température ambiante.

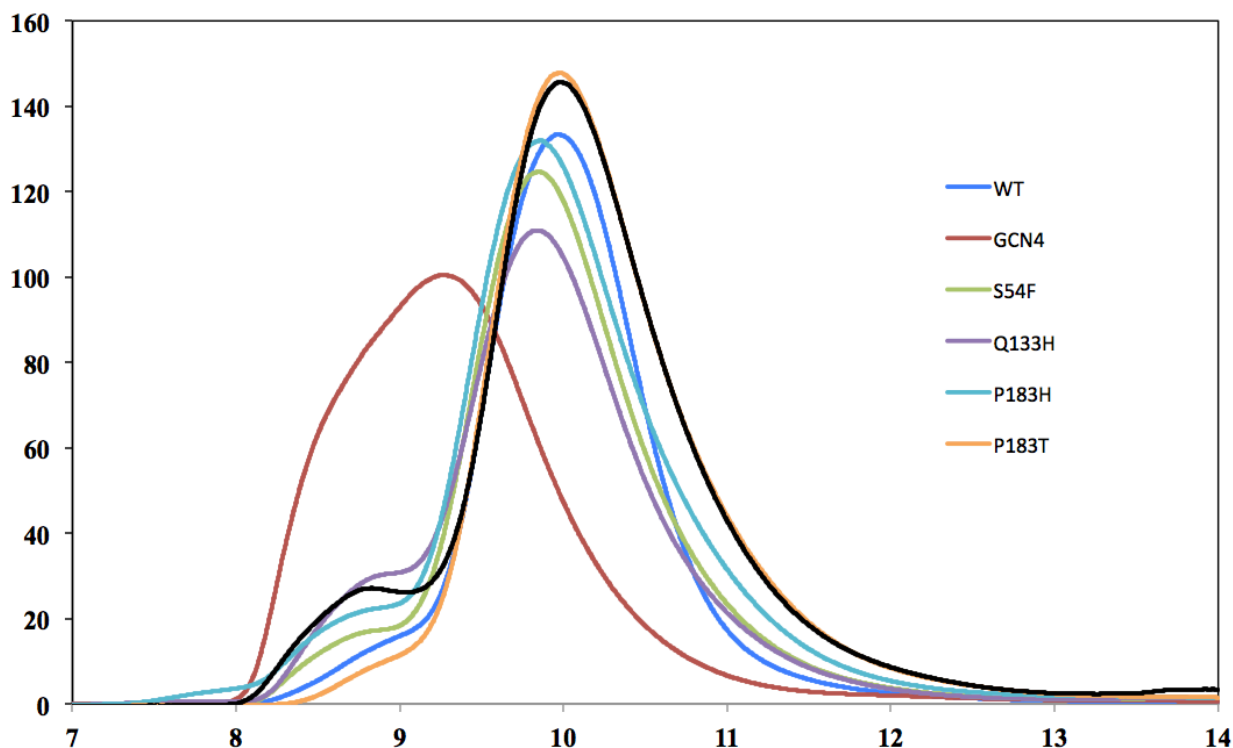


Figure 87 : Filtration sur gel du WT et des mutants à T = 0 après dialyse dans des conditions réductrices

Le WT et les mutants ont été dialysés dans du tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol, puis dilués à 1 de D.O. et injectés sur une Superdex 75 10/30 équilibrée dans le même tampon.

A $t = 0$, le WT et tous les mutants présentent une proportion majoritaire de monomères (volume d'élution autour de 10 mL). Un épaulement est cependant visible sur toutes les courbes (volume d'élution autour de 8.8 mL) correspondant à une petite proportion de dimères.

Sur le tableau en Figure 88 on peut voir les comparaisons des pourcentages de monomères et dimères à $t = 0$ et $t = 24h$. Les valeurs indiquées ont été calculées en mesurant l'aire sous les courbes de chaque chromatogramme. La ligne notée « % de perte après 24h » correspond à la soustraction des aires totales à $t = 0$ moins $t = 24h$. Cette perte d'échantillon après 24h à 20°C peut correspondre à la formation d'agrégats ou de filaments, ne pouvant pas passer le pré-filtre et donc ne pouvant pas rentrer dans la colonne.

		WT	S54F	Q133H	P183H	P183T	Del95-99
t = 0	Monomères	95	93	88	91	98	85
	Dimères	5	7	12	9	2	15
t = 24h	Monomères	67	82	71	110	43	85
	Dimères	6	7	10	13	1	11
% perte après 24h		27	11	19	-23	56	4

Figure 88 : Comparaison des GF du WT et des mutants à $T = 0$ et $T = 24h$

Les valeurs indiquées ont été calculées à partir des aires sous la courbe (AUC). Les aires sont mesurées entre 7 mL et 9.06 mL de volume d'élution pour les dimères et entre 9.06 mL et 13 mL de volume d'élution pour les monomères. Les AUCs totales des filtrations sur gel (GF) à $t = 0$ ont été normalisées à 100% pour chaque mutant. Les AUCs non normalisées des mutants entre eux à $t = 0$ n'étaient pas significativement différentes.

Le WT et P183T montrent une diminution de 28% et de 55% de leurs monomères au profit d'espèces plus grosses ou d'agrégats.

S54F et Q133H présentent le même comportement que le WT et P183T mais dans une moindre mesure (11 et 17%).

P183H ne voit pas son rapport monomère/dimère changer après 24h mais présente une quantité totale des deux espèces plus élevée. Il est possible que l'échantillon ait été agrégé à $t = 0$ et que cette agrégation se soit dissipée après 24h. Une autre possibilité, plus probable, est une erreur dans le prélèvement de l'échantillon avant injection.

Enfin le mutant Del95-99 ne change pratiquement pas, si ce n'est une perte faible de 4% de dimères au profit d'espèces plus grosses.

En microscopie électronique (Figure 89), on observe que tous les mutants, à l'exception de Del95-99, sont capables de former des filaments. Le mutant Q133H peut former des filaments, mais plus difficilement, ses filaments sont moins nombreux et plus courts. Les autres mutants semblent former des filaments très similaires à ceux observés pour le WT.

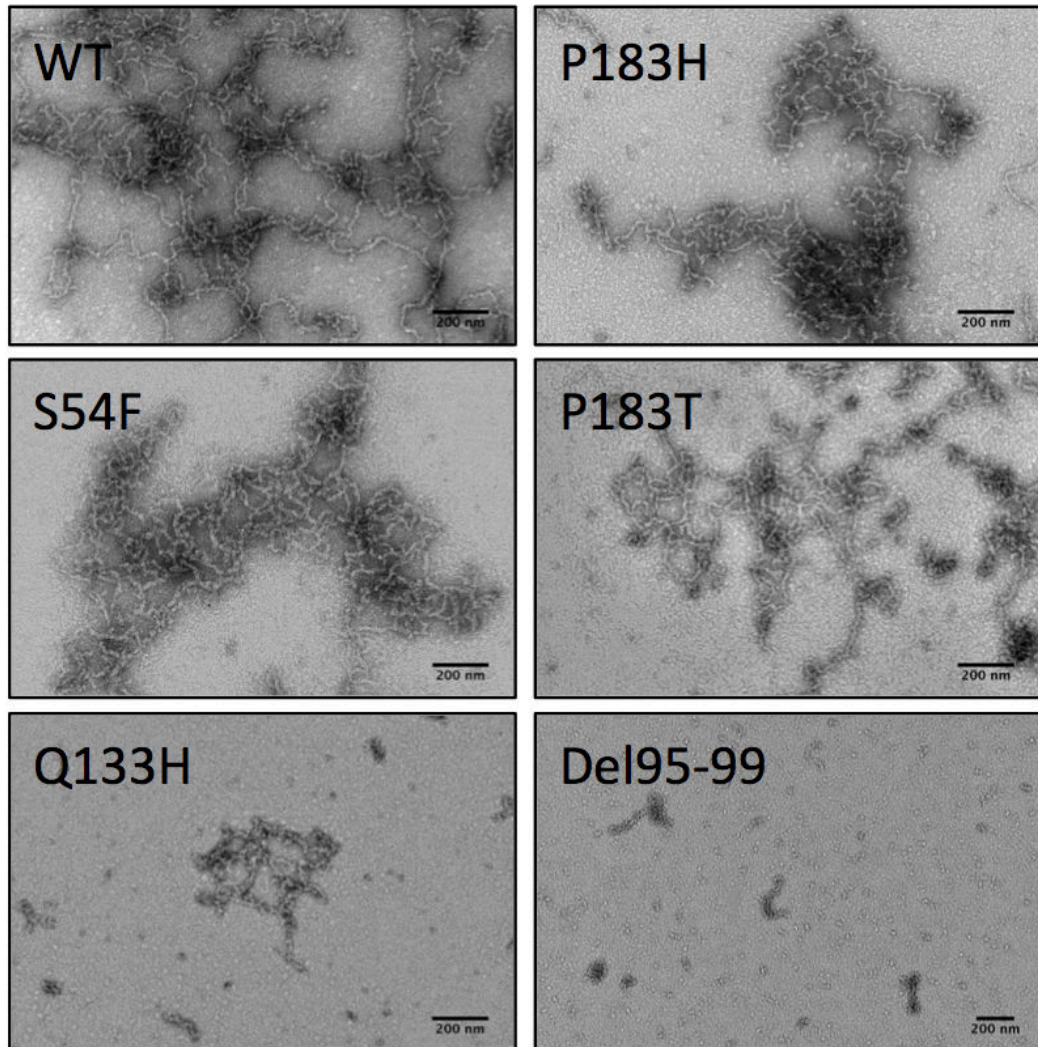


Figure 89 : Images de MET réalisées sur des échantillons d'émerine WT et de mutants EDMD

Les échantillons (WT et mutants) ont été dialysés dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol puis concentrés jusqu'à une D.O. de 15 (560 μ M). Après 1h de chauffe à 65°C, les échantillons ont été dilués 10 fois avant d'être déposés sur grille de microscopie et observés sur la plateforme d'Imagif.

J'ai émis l'hypothèse que les cinétiques d'assemblage en filaments pourraient être différentes d'un mutant à l'autre.

Étant donné la présence de feuillet β dans les filaments, j'ai décidé de suivre les cinétiques d'assemblage en utilisant les propriétés de fluorescence de la Thioflavine (c.f. Figure 74).

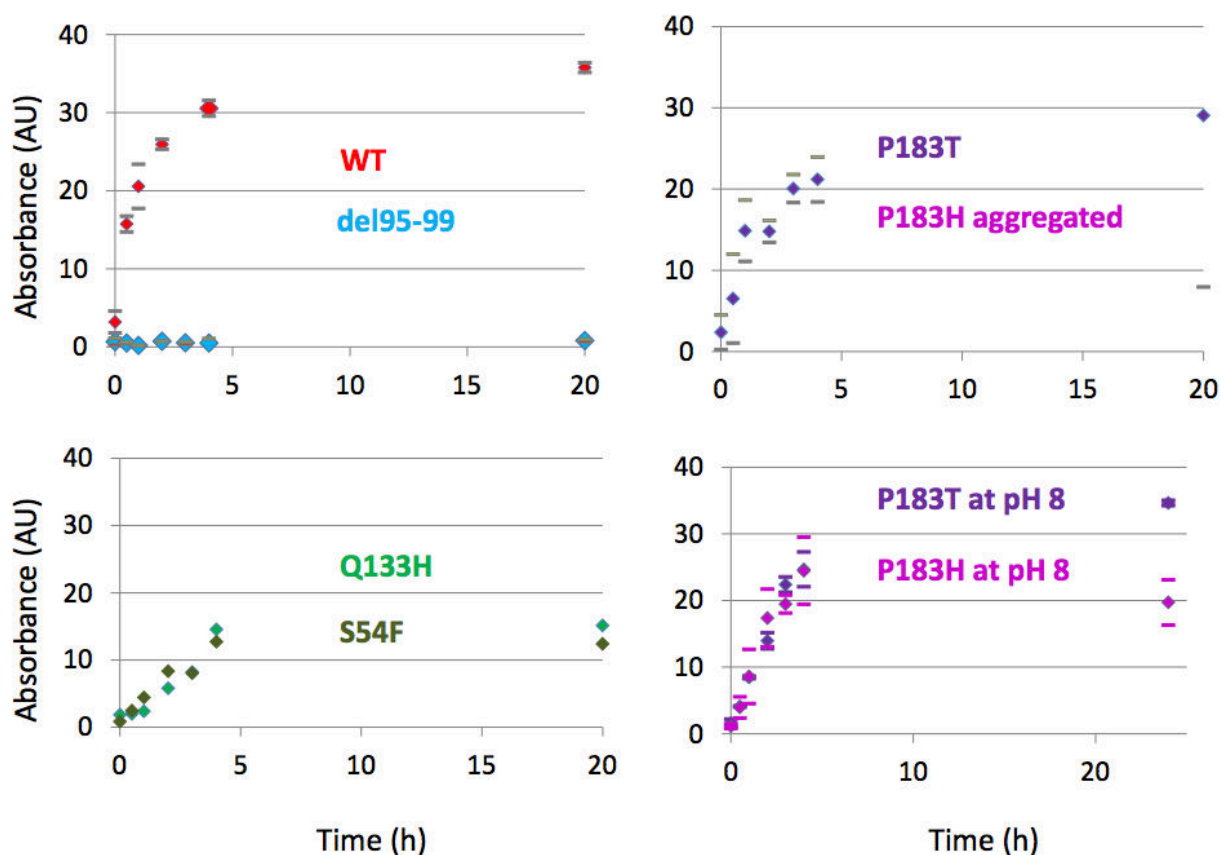


Figure 90 : Cinétiques d'assemblage des filaments du WT et des mutants par fluorescence à pH 6.8

Spectres obtenu sur des échantillons de WT et de mutants à 300 μ M dans 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol ajusté ensuite à pH 6.8. Les échantillons sont chauffés à 37°C pendant 24h et des mesures sont faites régulièrement en prélevant un peu d'échantillon et en le diluant (40 μ M final) dans une solution de ThT (10 μ M final).

Les cinétiques ont tout d'abord été suivies en ajoutant 1 mM de TCEP au temps 0 (Figure 90). Ceci pour être complètement sûre de commencer la cinétique avec uniquement du monomère. Cependant l'ajout de TCEP-HCl a fait systématiquement chuter le pH de 8.0 à 6.8 et a engendré des problèmes d'agrégation qui ont perturbé les mesures, de manière reproductible dans le cas des mutants de la proline 183. Ces expériences ont tout de même confirmé que tous les mutants, à l'exception de Del95-99, étaient capables de former des filaments dans nos conditions. Elles ont de plus suggéré dans le cas des mutants de la proline 183 que le manque de signal caractérisant l'assemblage observé à pH 6.8 était dû à un phénomène d'agrégation dépendant du pH. En effet à pH 8.0, ces mutants ne présentent plus de problèmes d'agrégation.

Il a été décidé de lutter contre les problèmes d'agrégation de deux manières : (1) en coupant l'étiquette poly-histidines, (2) en restant à pH 8.0. Avec Camille Samson, doctorante au laboratoire, nous avons alors obtenu des résultats extrêmement reproductibles (Figure 91).

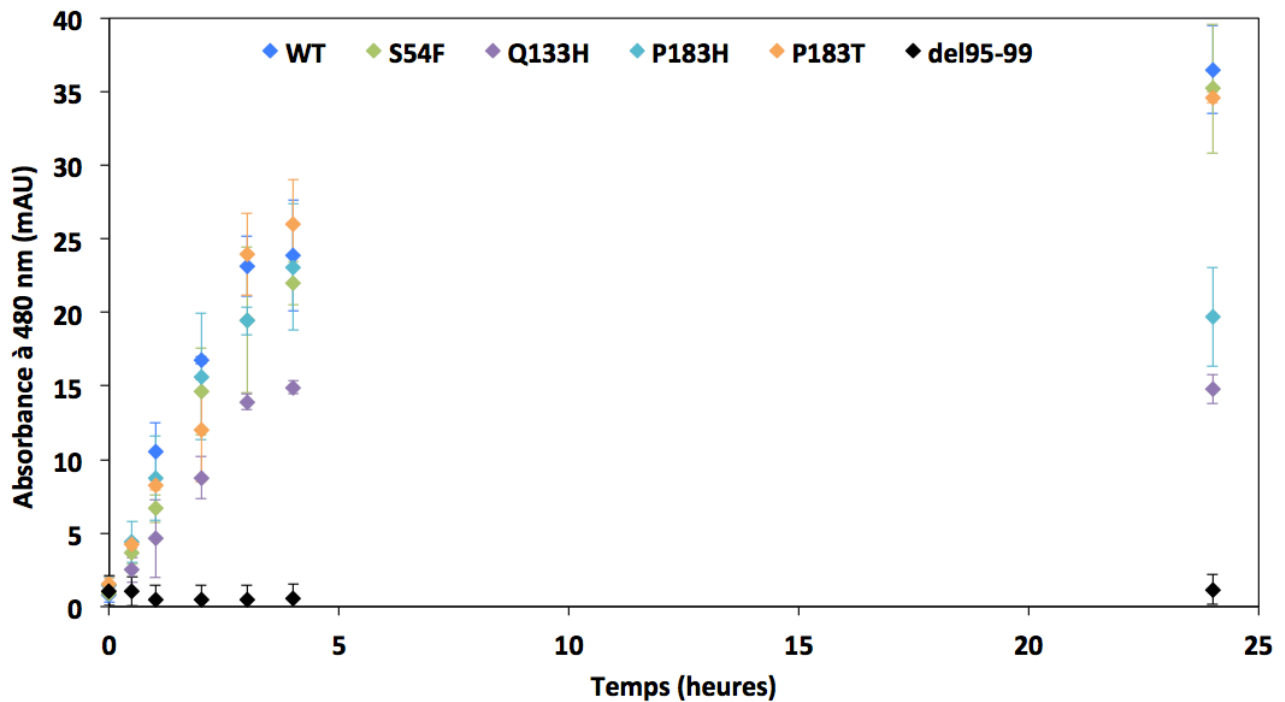


Figure 91 : Cinétiques d'assemblage des filaments du WT et des mutants par fluorescence à pH 8

Spectres obtenus sur des échantillons de WT et de mutants sans leur étiquette poly-histidine, à 300 μ M dans 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl et 10 mM β -mercaptoéthanol. Les échantillons sont chauffés à 37°C pendant 24h et des mesures sont faites régulièrement en prélevant un peu d'échantillon et en le diluant (40 μ M final) dans une solution de ThT (10 μ M final).

Nous avons montré les phénomènes suivants :

- WT, S54F, P183T et P183H ont la même cinétique d'assemblage
- Q133H est défectueux dans son processus d'assemblage mais une augmentation de fluorescence due à l'apparition de feuillet β est quand même observée
- Del95-99 ne forme pas de filaments dans nos conditions

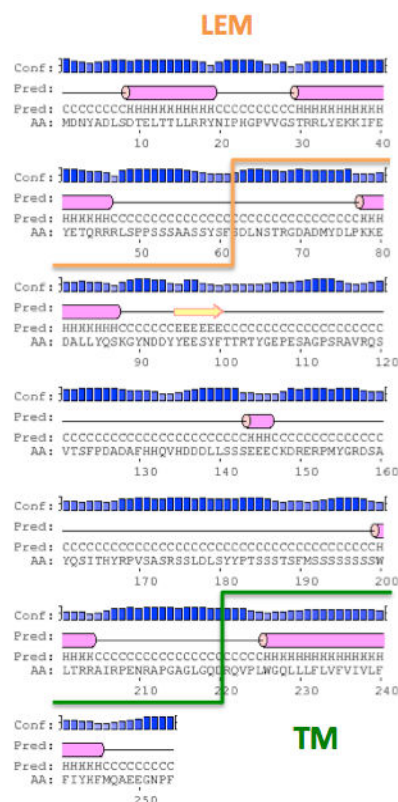


Figure 92 : Prédiction de structures secondaires de l'émerine par Psipred ²¹⁵

Le mutant Del95-99 est, parmi les 5 mutants que j'ai étudiés, celui qui a un comportement le plus particulier. En effet, c'est le seul qui dans toutes les conditions testées ne forme pas de filaments. Je sais désormais que la formation de feuillets β antiparallèles est à l'origine de l'association des monomères d'émerine en oligomères de haut poids moléculaire. Or lorsque je regarde les prédictions de structures secondaires réalisées grâce au programme Psipred ²¹⁵ (Figure 92), je vois que la seule région prédite comme pouvant adopter un repliement de type β est localisée des résidus 95 à 100. Il semble donc logique que la délétion de ces résidus dans le mutant Del95-99 empêche la formation de feuillet β et ainsi l'auto-association de l'émerine en filaments. Etant le seul mutant à avoir été montré incapable de lier la lamine, j'ai émis l'hypothèse que l'assemblage de l'émerine en oligomères voire filaments pourrait être nécessaire pour son interaction avec la lamine A. Enfin, le mutant Del95-99 ne contient plus la tyrosine 95, connue pour être phosphorylée par Src après un stress mécanique. Cette phosphorylation permet au noyau de s'adapter à la force. On peut donc imaginer une régulation de l'assemblage en filaments de l'émerine par les phosphorylations à la fois dans un contexte de stress mécanique (pour moduler la résistance et la déformation du noyau), mais aussi dans un contexte de cycle cellulaire (assemblage et désassemblage de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose).

Nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Brigitte Buendia à l'université Paris Diderot, ont regardé les proximités émerine - émerine pour le WT et les mutants Del95-99, Q133H et P183T dans la cellule, grâce à des expériences de PLA (Proximity Ligation Assay) (Figure 93).

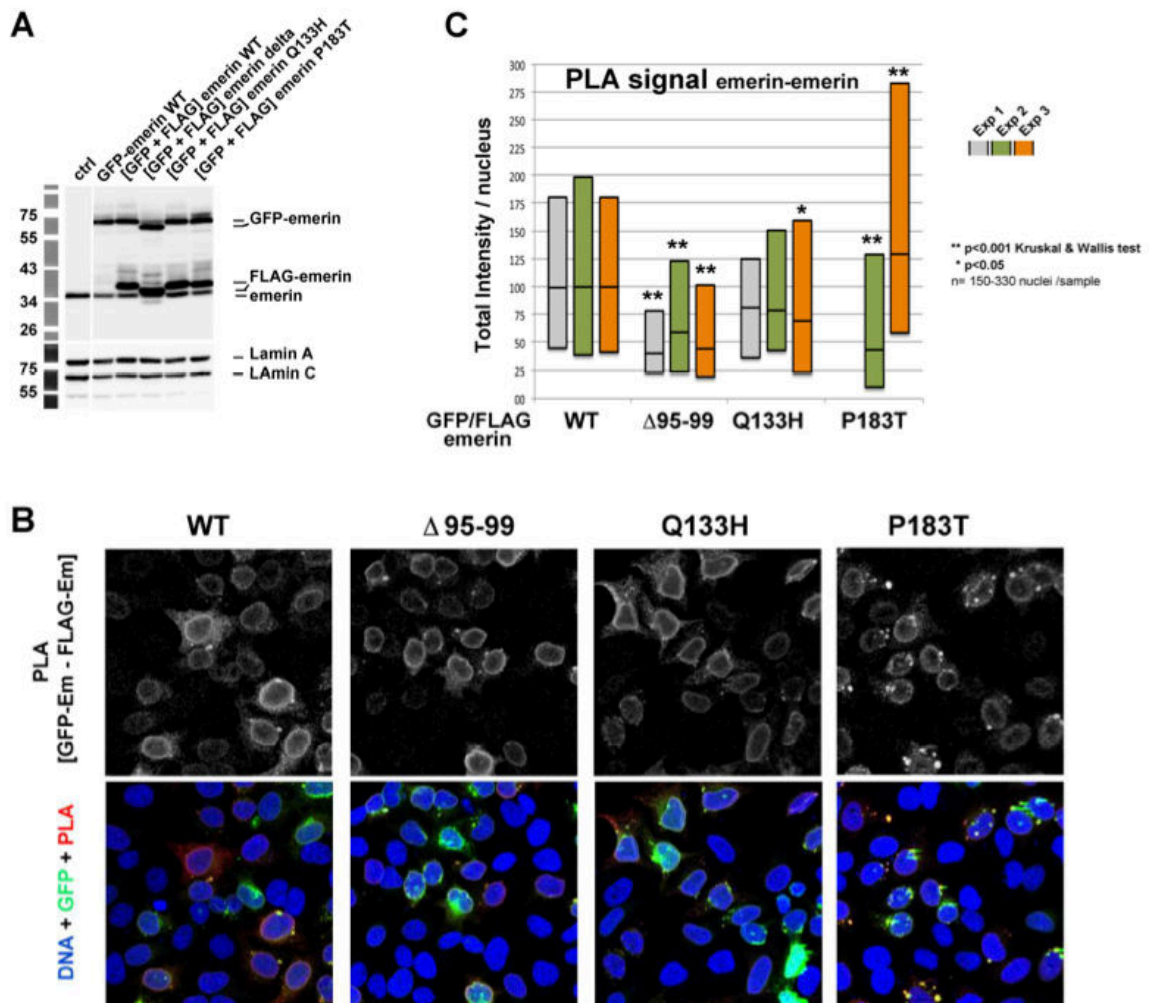


Figure 93 : PLA émerine-émerine sur le WT et les mutants EDMD dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2 plasmides différents, 1 codant pour GFP-émerine, l'autre codant pour FLAG-émerine. Les émerines testées sont le WT, Del95-99, Q133H et P183T. La détection se fait d'abord par ajout d'anticorps primaires (anticorps de souris anti-GFP et anticorps de lapin anti-FLAG) puis par des anticorps secondaires Duolink couplés à des oligonucléotides (PLA probe anti-mouse minus et PLA probe anti-rabbit plus). Les réactifs de détection Duolink sont ensuite ajoutés, permettant d'observer un point rouge chaque fois que les 2 anticorps secondaires plus et moins sont proches dans l'espace.

La quantification des proximités émerine-émerine à la périphérie nucléaire des cellules HeLa montre que les mutants Del95-99 et Q133H forment moins de proximités émerine-émerine que le WT. Le cas du mutant P183T est particulier car il s'accumule en foyers dans le réticulum endoplasmique, et seulement une fraction de ce mutant atteint la membrane nucléaire interne. Il est donc difficile de conclure sur le nombre de proximités émerine-émerine observées par PLA pour ce mutant.

II.3.2. Étude préliminaire de 3 mutations retrouvées dans le domaine LEM de l'émerine

Trois nouvelles mutations de l'émerine, P22L, DelK37 et T43I ont été découvertes par l'équipe du Dr. Gisèle Bonne, chez des patients atteints de Cardiomyopathie dilatée (CMD) liée à l'X.

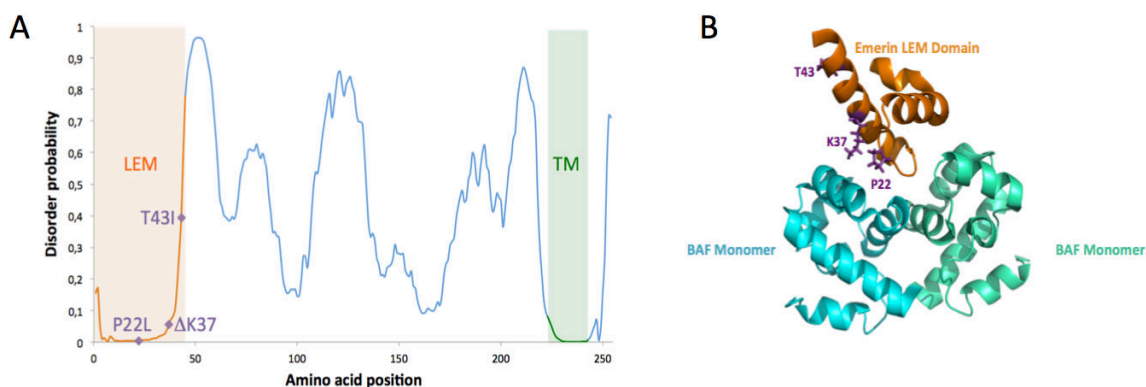


Figure 94 : 3 nouveaux mutants causant la CMD sont localisés dans le domaine LEM

A. Diagramme de prédiction de désordre de l'émerine par Disopred2.0²⁰⁰. Les deux domaines structurés sont représentés en couleur (Le domaine LEM en orange et le domaine TM en vert). La localisation des 3 nouvelles mutations causant la Cardiomyopathie dilatée sont représentées par des losanges violets. **B.** Modèle de la structure du complexe entre 2 monomères de BAF (vert et cyan) et un domaine LEM de l'émerine (orange) PDB : 2ODG. Les mutations causant la CMD sont représentées en violet.

Mon hypothèse est qu'étant donné que ces trois mutations sont localisées dans le domaine LEM de l'émerine (Figure 94A), elles pourraient avoir un effet sur l'interaction de l'émerine avec BAF. En regardant la position de ces 3 résidus mutés sur la structure du complexe émerine / BAF₂ (Figure 94B) on voit clairement que 2 d'entre eux (P22 et K37) sont localisés à l'interface de l'interaction avec BAF. Pour le résidu T43I, il est plus difficile de conclure à une rupture possible de l'interaction après mutation. J'ai inséré ces 3 mutations dans ma construction d'émerine 1-187 par mutagénèse dirigée et vérifié la séquence des plasmides obtenus. Les tests d'expression aboutissent au même protocole de production que pour le WT. Les protéines mutantes sont exprimées, comme le WT, en quantités largement suffisantes pour des expériences de biologie structurale et biophysique, mais se retrouvent dans des corps d'inclusions.

Je souhaite maintenant tester l'interaction entre ces mutants et la protéine BAF par RMN, en réalisant le marquage isotopique sur les émerines mutantes de façon à contrôler le bon repliement du domaine LEM après purification dans l'urée. J'aimerais également étudier l'impact de ces mutations sur l'état oligomérique de l'émerine et sa capacité à former des filaments ainsi que sur sa capacité à être phosphorylée.

II.3.3. Attribution du spectre RMN de l'émerine

Afin de déterminer quels sont les résidus de l'émerine phosphorylés ou impliqués dans les interactions avec les partenaires, l'attribution du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de l'émerine est indispensable. L'attribution est possible grâce à des expériences de RMN à 3 dimensions permettant pour chaque pic de l'HSQC (chaque pic correspond à un couple N- H_N du squelette peptidique), d'observer les déplacements chimiques (δ ^{13}C) des carbones ($\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ ou encore CO) correspondant au même résidu (i) ou au résidu précédent dans la séquence ($i - 1$), donnant une idée de la nature de ces acides aminés (Figure 95). De cette façon, il est possible de déterminer, par une attribution séquentielle et pour quasiment la totalité des pics de l'HSQC, à quel acide aminé dans la protéine le pic correspond.

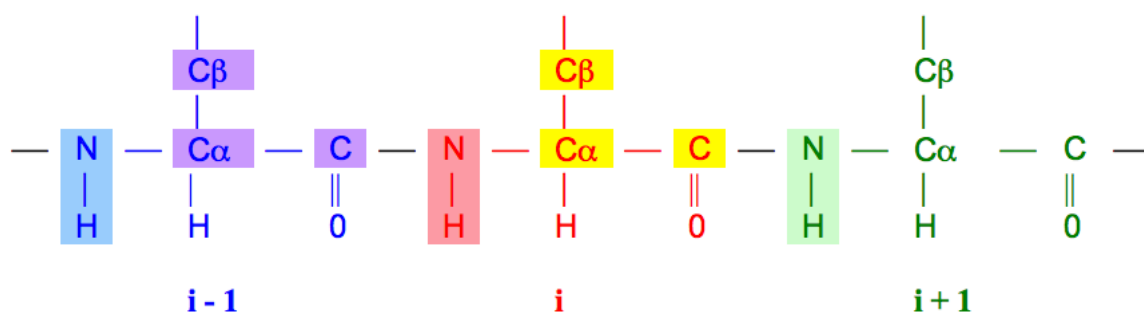


Figure 95 : Représentation schématique des corrélations observées par RMN

Représentation d'une séquence de 3 acides aminés ($i - 1$, i et $i + 1$) centrés sur l'acide aminé que l'on observe i . Chaque corrélation N- H_N de chaque résidu (en bleu pour $i - 1$, rouge pour i et vert pour $i + 1$) va donner 1 pic sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC (spectre à 2 dimensions). Des expériences d'attribution vont permettre d'ajouter à l'HSQC, une troisième dimension ^{13}C . Dépendamment de la séquence d'impulsion de l'expérience RMN, on va pouvoir observer les carbones alpha ($\text{C}\alpha$), les carbones bêta ($\text{C}\beta$) ou les carbones des carbonyles ($\text{C}=\text{O}$) du résidu lui même (jaune) ou du résidu précédent (violet).

J'ai essayé à plusieurs reprises de lancer des expériences d'attribution des signaux RMN de l'émerine, mais en raison de la capacité de l'émerine à oligomériser rapidement et du fait que ces expériences sont longues (plusieurs jours d'acquisition sont nécessaires sur un échantillon très concentré), la perte de signal due à l'augmentation en taille de l'échantillon ne m'a pas permis de réaliser ces expériences.

Deux nouvelles approches sont considérées pour attribuer cette protéine. La première est d'attribuer l'HSQC d'un mutant (Del95-99) ou d'une construction plus courte que 1-187 et ne formant pas de filament. La deuxième est d'effectuer l'attribution de l'émerine dans 8 M urée. Florian Celli, étudiant en Master2 dans mon équipe, a décidé de combiner ces deux approches et a produit et purifié la construction 67-170 (qui ne forme pas de filaments dans nos conditions) et a réalisé les spectres d'attribution de cette construction dans 8 M urée (Figure 96). Jusqu'à ce jour, environ 50% des pics de l'HSQC ont été attribués à des acides aminés de l'émerine.

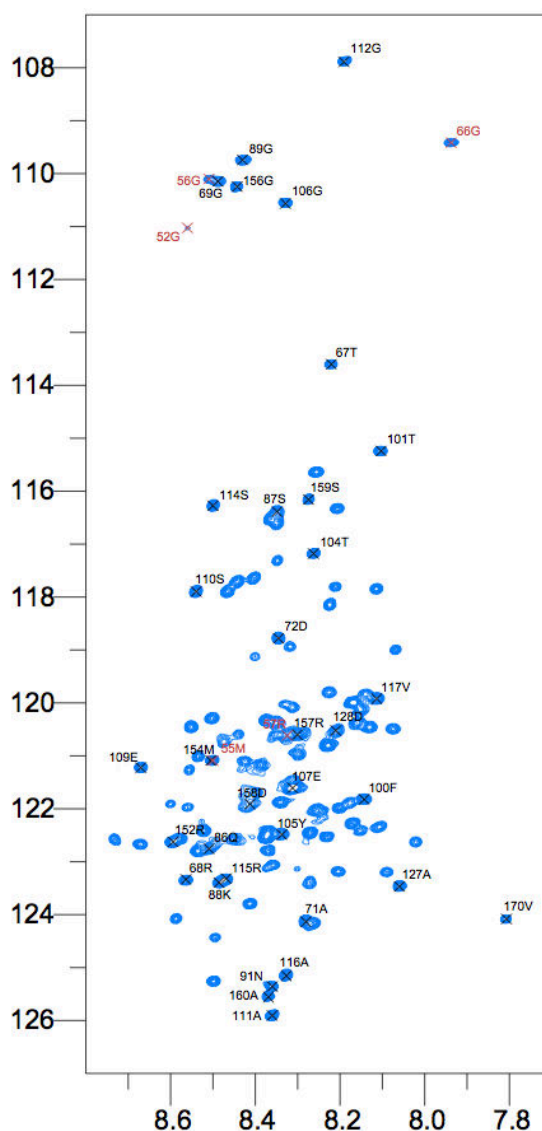


Figure 96 : Attribution partielle des résidus de l'émerine sur l'HSQC

^1H - ^{15}N HSQC réalisée sur l'échantillon d'émerine 67-170 à 300 μM dans un tampon 20 mM Phosphate pH 6.5, 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM TCEP et 8 M urée, sur un spectromètre Bruker 750 MHz équipé d'une cryosonde et à 30°C. Les pics attribués sont notés sur le spectre de la façon suivante : 000X ; 000 représentant la position du résidu dans la séquence de l'émerine et X le type d'acide aminé. Les résidus en rouge correspondent à des résidus de l'étiquette histidine ou du linker.

Dans les conditions de l'attribution (8 M urée) l'émerine ne peut s'auto-associer, ce qui facilite l'acquisition et augmente l'intensité des signaux obtenus. Le problème étant que les HSQCs à 0 et 8 M sont très différentes l'une de l'autre. Afin de déterminer quel pic sur l'HSQC à 8 M correspond à quel pic sur l'HSQC à 0 M, une titration a été réalisée en augmentant progressivement la quantité d'urée dans un échantillon d'émerine (Figure 97).

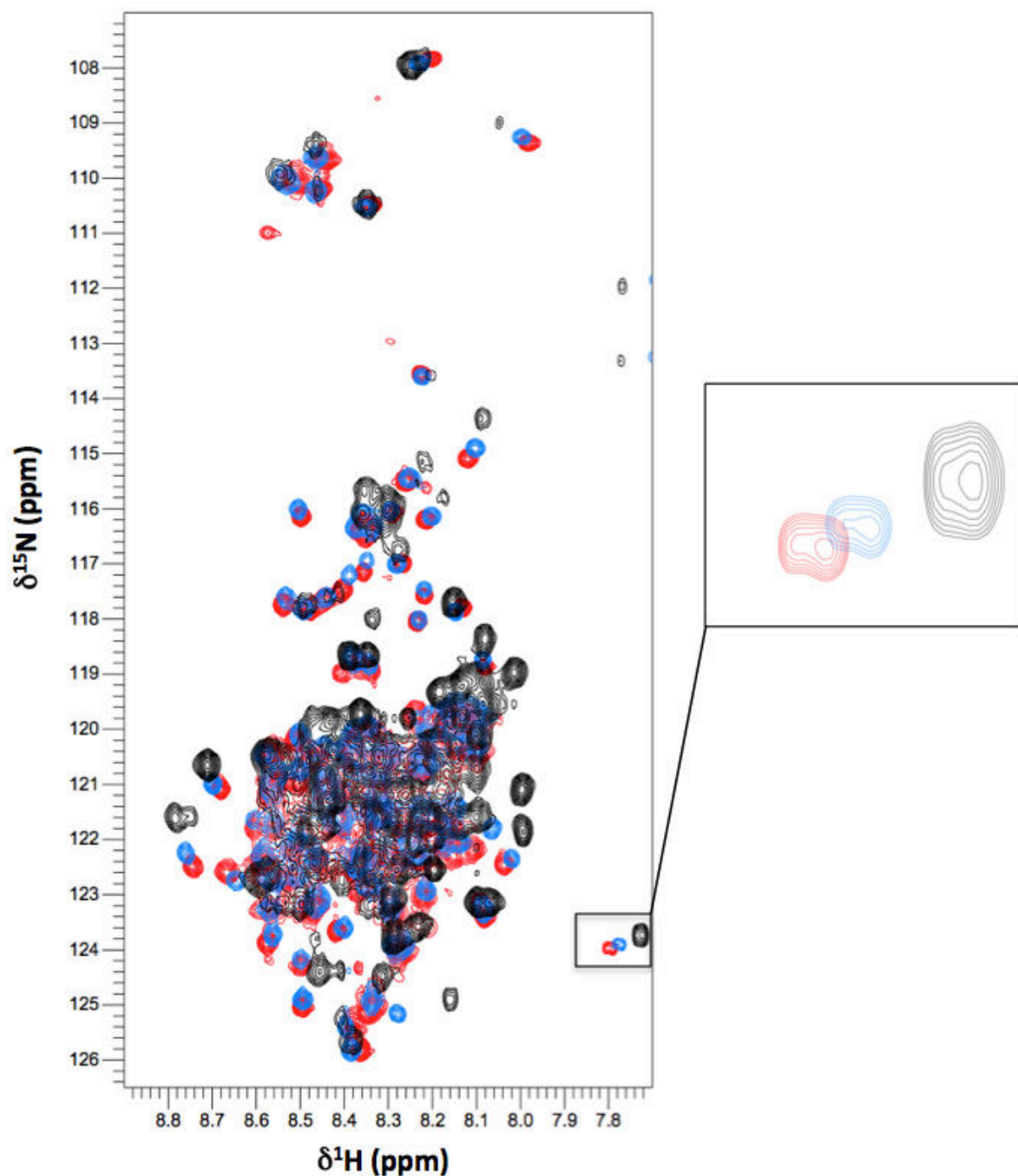


Figure 97 : Superposition des HSQCs de l'émerine dans différentes concentrations en urée

Des ^1H - ^{15}N HSQCs ont été réalisées sur des échantillons d'émerine 67-170 à 300 μM dans un tampon 20 mM Phosphate pH 6.5, 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol et 1 mM TCEP contenant différentes concentrations en urée. Sur cette figure sont représentées les HSQCs à 0 (noir), 4 (bleu) ou 8 M urée (rouge).

III. RETOUR SUR L'INTERACTION ÉMERINE – LAMINE A

N'ayant pas retrouvé d'interaction entre la lamine A et l'émerine monomérique (Figure 53 et Figure 98A), et après avoir caractérisé les différents états oligomériques de l'émerine, je me suis demandé si les autres formes oligomériques de l'émerine pouvaient lier la lamine A *in vitro*. J'ai reproduit l'interaction émerine 1-187 / lamine A 389-646 par RMN en utilisant l'émerine en sortie de dialyse (donc sans sélectionner les monomères par GF) ajoutée directement sur la lamine A 389-646 marquée ^{15}N . Une diminution des intensités de certains pics de la lamine A en présence d'émerine en sortie de dialyse est observée (Figure 98B)

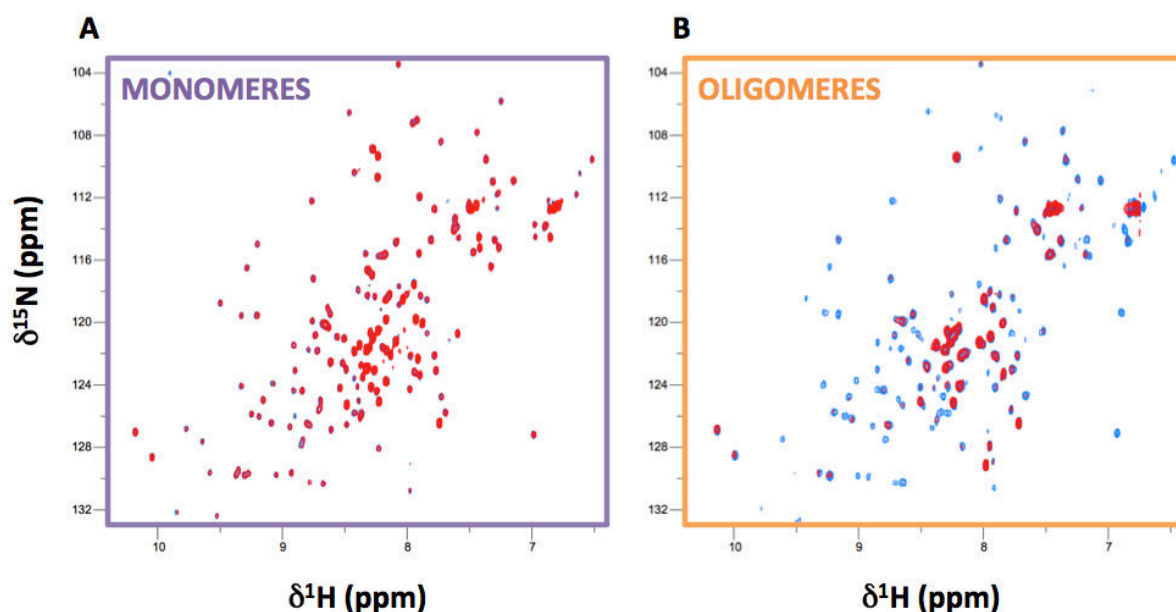


Figure 98 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 389-646 par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 389-646 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence d'émerine 1-187 (en rouge). **A.** Émerine utilisée sous forme de monomères dans un tampon 50 mM Phosphate pH 6.7, 150 mM NaCl, et 1 mM TCEP. **B.** Émerine en sortie de dialyse dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl et 1 mM TCEP.

J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic correspondant aux résidus de la lamine A 389-646 après contact avec l'émerine (monomères ou en sortie de dialyse) en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A (389 – 646) – émerine}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A (389 – 646) seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (μ) et l'écart type (σ) de ces R.

ATTENTION, tout au long de cette thèse, je vais utiliser la nomenclature suivante, déterminée par rapport aux valeurs mathématiques de moyenne (m) et d'écart type (σ) :

Pas affectés	$\Rightarrow R < m - 2\sigma$
Peu affectés	$\Rightarrow m - 2\sigma < R < m - \sigma$
Intermédiaires	$\Rightarrow m - \sigma < R < m + \sigma$
Moyennement affectés	$\Rightarrow m + \sigma < R < m + 2\sigma$
Très affectés	$\Rightarrow m + 2\sigma < R$

Il faut cependant être très vigilant et également prendre en compte la valeur absolue de la moyenne qui elle aussi détermine la présence et la force de l'interaction. A titre d'exemple, je vais comparer deux expériences A et B (A : $m = 20\%$ et $\sigma = 5\%$ et B : $m = 90\%$ et $\sigma = 5\%$).

Dans l'expérience A, les pics voient leur intensité diminuer de 80% en moyenne en présence du partenaire, ce qui signifie qu'il y a une interaction. Les pics considérés alors comme « peu affectés » voient leur intensité diminuer de 70% à 75%.

Dans l'expérience B, les pics voient leur intensité diminuer de 10% en présence du partenaire, ce qui ne permet pas de conclure à une interaction. Les pics considérés alors comme « moyennement affectés », voient leur intensité diminuer de 5% à 10%.

Pour l'expérience lamine A 389-646 / monomères d'émerine : $m = 88.7$ et $\sigma = 9.7$

Pour l'expérience lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse : $m = 47.6$ et $\sigma = 13.9$

Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 389-646 de **11.3 %** en présence de monomères d'émerine et de **52.4%** en présence d'émerine en sortie de dialyse.

Une interaction est visible entre l'émerine en sortie de dialyse et la lamine A 389-646. Ayant l'attribution des signaux RMN du domaine IgFold de la lamine A (des résidus 428 à 549, PDB : 1IVT), j'ai attribué sur mon spectre de la lamine A 389-646 les pics de l'IgFold (428-549). J'ai considéré les autres pics comme faisant partie des régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold (389-427 et 550-646).

Je définis les pics pas ou peu affectés, intermédiaires, moyennement affectés et très affectés de la manière suivante :

Peu ou pas affectés	\Rightarrow	$R < m - \sigma$
Intermédiaires	\Rightarrow	$m - \sigma < R < m + \sigma$
Moyennement ou très affectés	\Rightarrow	$R > m + \sigma$

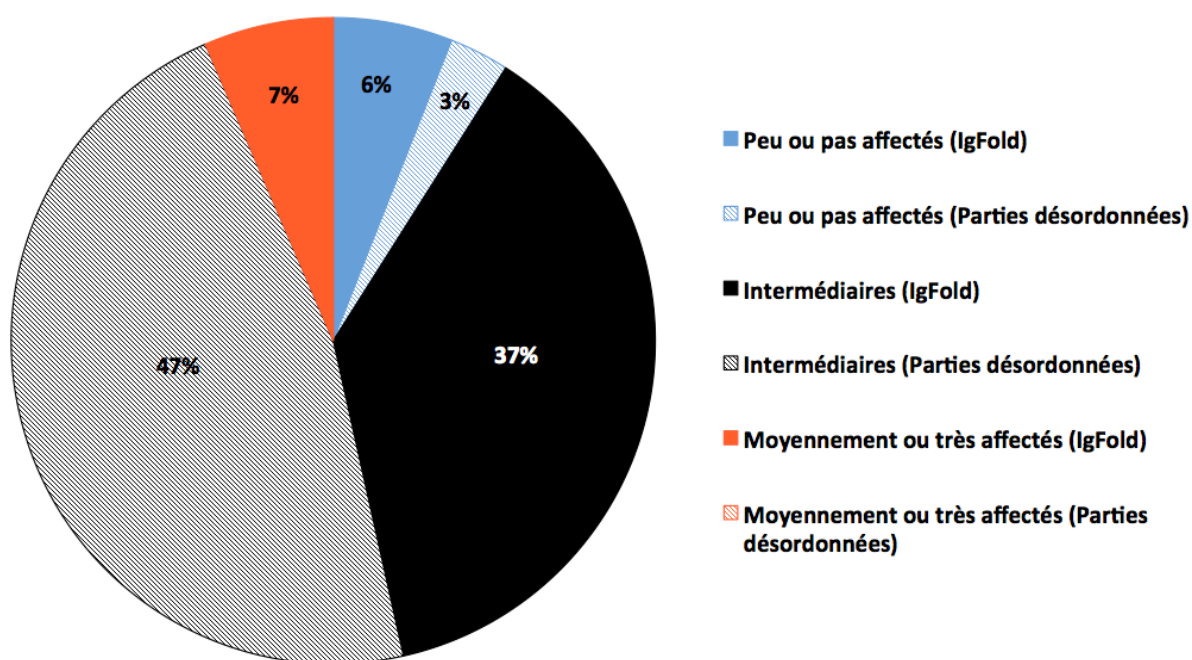


Figure 99 : Résidus de la lamine A 389-646 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse

Les ratios d'intensité des résidus de l'IgFold 428-549 (en couleur pleine) et des parties désordonnées (en couleur hachurée) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état ; Peu ou pas affectés (bleu), Intermédiaires (noir) et Moyennement ou très affectés (orange).

Sur la Figure 92 on observe :

- 7% des pics de la lamine A 389-646 sont **moyennement ou très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 66.3%). Ces pics correspondent tous à des résidus de l'IgFold (428-549).
- 84% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 38.5 et 66.3%). 56% de ces pics correspondent à des résidus des parties désordonnées (389-427 et 550-646).
- 9% sont **peu ou pas affectés** (diminution d'intensité inférieure à 38.5%) et 67% de ces pics correspondent à des résidus de l'IgFold (428-549).

Je ne possède pas l'attribution complète des signaux RMN du domaine 389-646, mais uniquement celle des signaux de l'IgFold 428-549 (PDB : 1IVT). J'ai donc pu calculer les ratios d'intensité de chaque pic (du spectre HSQC de la lamine A 389-646) correspondant à un résidu de l'IgFold, avec/sans émerine. Ces ratios sont présentés en Figure 100.

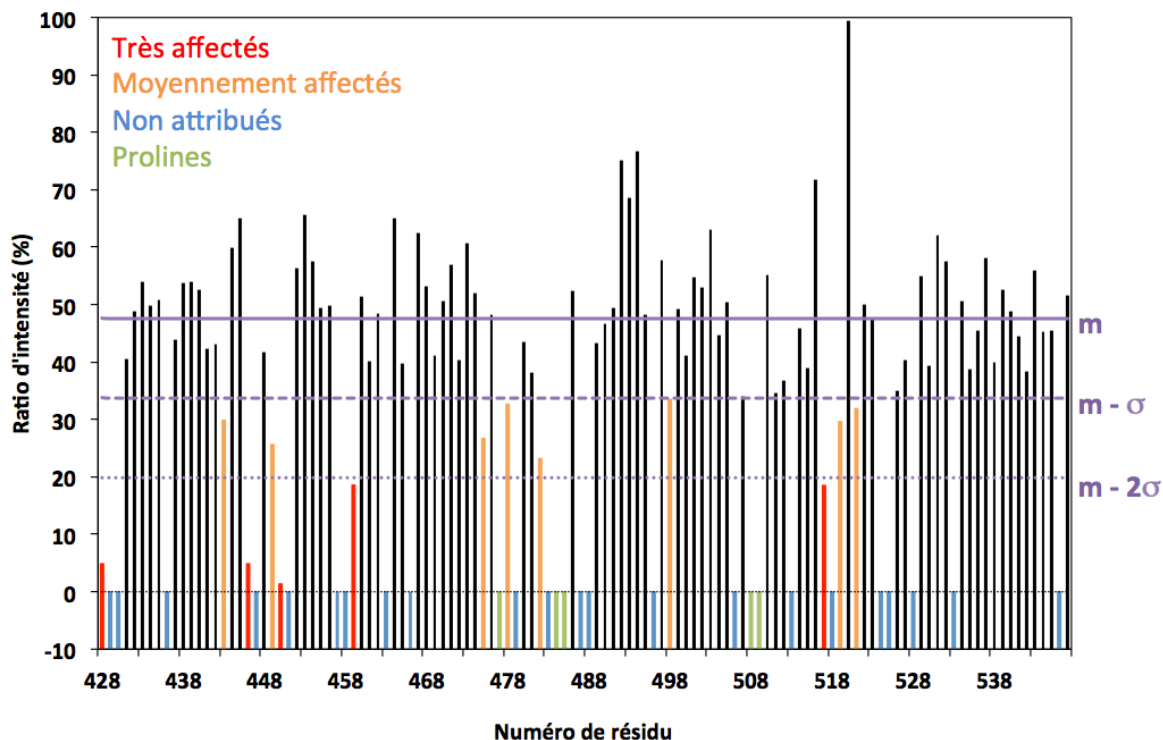


Figure 100 : Ratio d'intensité pour chaque pic de l'IgFold de l'expérience RMN d'interaction entre lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse

Les ratios sont calculés en prenant l'intensité du pic sur le spectre de la lamine A 423-566 en présence d'émerine divisée par l'intensité du pic sur le spectre de la lamine A seule. Les pics non attribués sont représentés en bleu ou en vert dans le cas des prolines. Les résidus très affectés sont en rouge et les résidus moyennement affectés en orange.

Alors que pour la première expérience (avec les monomères d'émerine), les intensités des pics de l'IgFold ne changent pas en présence d'émerine (valeurs autour de 100%), pour la deuxième expérience d'interaction, les pics de l'IgFold voient leurs intensités diminuer en présence d'oligomères d'émerine (Figure 100). On observe une diminution globale de tous les pics de l'IgFold, sans observer de régions particulièrement affectées. Cette analyse ne me permet ni d'identifier les résidus en interaction directe avec l'émerine, ni la conformation de l'émerine liée à la lamine.

Le gel SDS-PAGE correspondant à l'expérience RMN entre la lamine A 389-646 et l'émerine en sortie de dialyse est présenté en [Figure 101](#). Malgré la diminution conséquente de l'intensité des pics de la lamine A sur le spectre RMN en présence d'émerine, les échantillons étaient limpides et donc non précipités et les protéines étaient non dégradées sur gel SDS-PAGE.

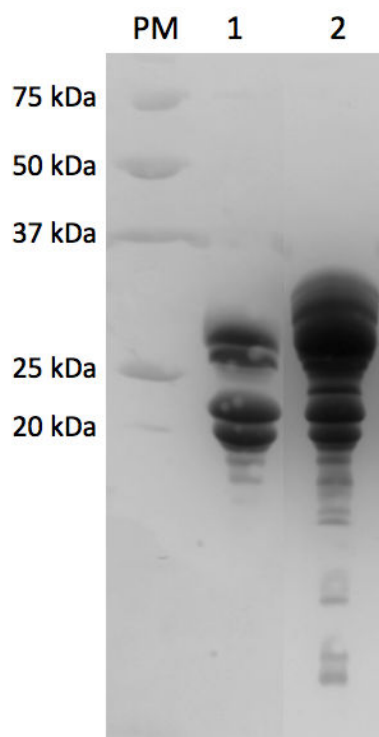


Figure 101 : Gel SDS-PAGE de l'interaction RMN lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse

Les deux échantillons de RMN ont été déposés sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Dans le puits 1, correspondant à l'échantillon de lamine A 389-646 ^{15}N seule, la lamine A présente ses 4 bandes caractéristiques et ne semble pas être dégradée. Dans le puits 2, correspondant à l'échantillon de complexe (lamine A ^{15}N + émerine en sortie de dialyse) on observe bien la présence d'émerine au bon poids moléculaire.

Dans l'expérience lamine A 389-646 / émerine en sortie de dialyse, les pics correspondants aux résidus de l'IgFold sont plus affectés que les pics correspondants aux parties déstructurées par la présence d'émerine. J'ai par conséquent reproduit la même expérience en utilisant la construction de lamine A 423-566 contenant presque uniquement l'IgFold (428-549).

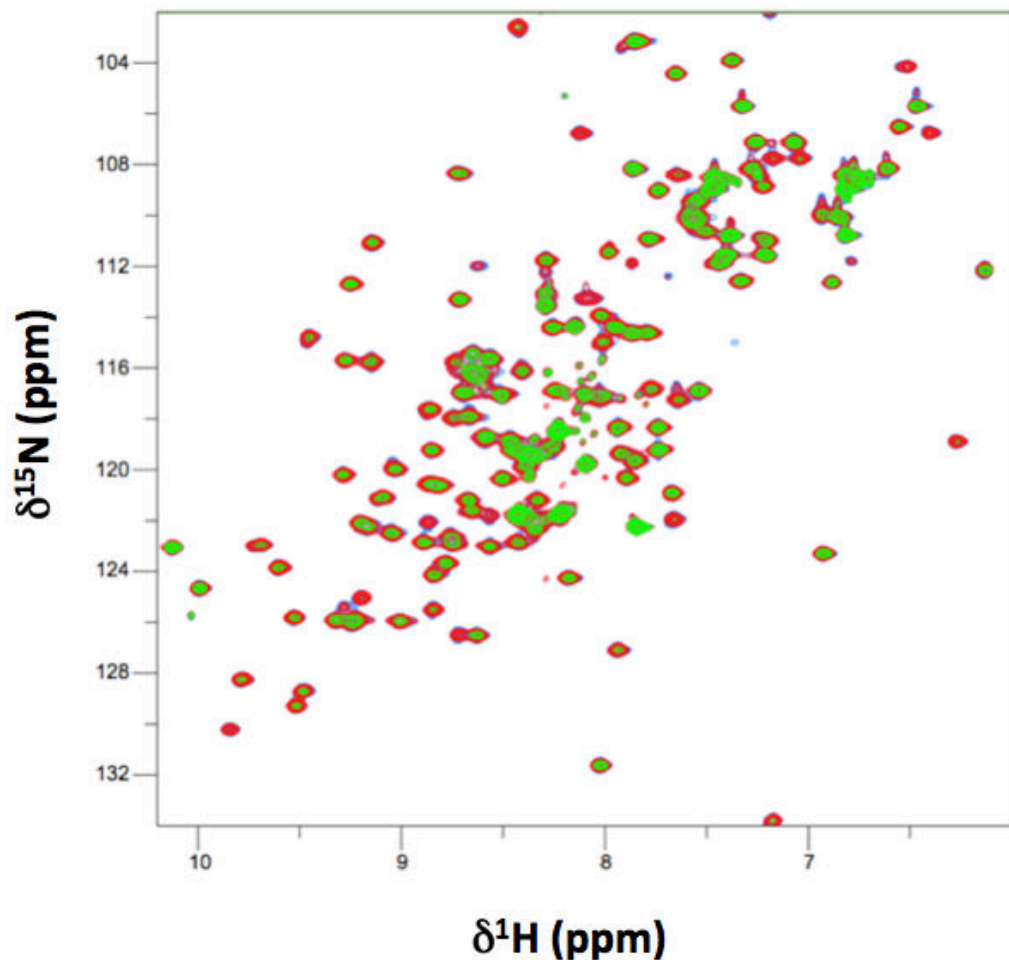


Figure 102 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 423-566 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence d'oligomères d'émerine 1-187 (0.25 équivalents en rouge et 0.50 équivalents en vert). Tampon : 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol et 10X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases EDTA-free (Roche).

Une interaction est visible entre l'émerine en sortie de dialyse et la lamine A 423-566. Ayant l'attribution du domaine IgFold de la lamine A (des résidus 428 à 549, PDB : 1IVT), j'ai attribué sur mon spectre de la lamine A 423-566 les pics de l'IgFold 428-549. J'ai considéré les autres pics comme étant les 22 pics faisant partie des régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold (423-427 et 550-566).

J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic de la lamine A 389-646 après contact avec l'émerine (0,5 équivalents) en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 - 566) - émerine}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 - 566) seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, $m = 21.7$ et $\sigma = 6.2$. Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 423-566 de 78.3 % en présence d'émerine.

Je définis les pics peu ou pas affectés, intermédiaires, moyennement affectés et très affectés de la manière suivante :

Peu ou pas affectés	=>	$R < m - \sigma$
Intermédiaires	=>	$m - \sigma < R < m + \sigma$
Moyennement ou très affectés	=>	$R > m + \sigma$

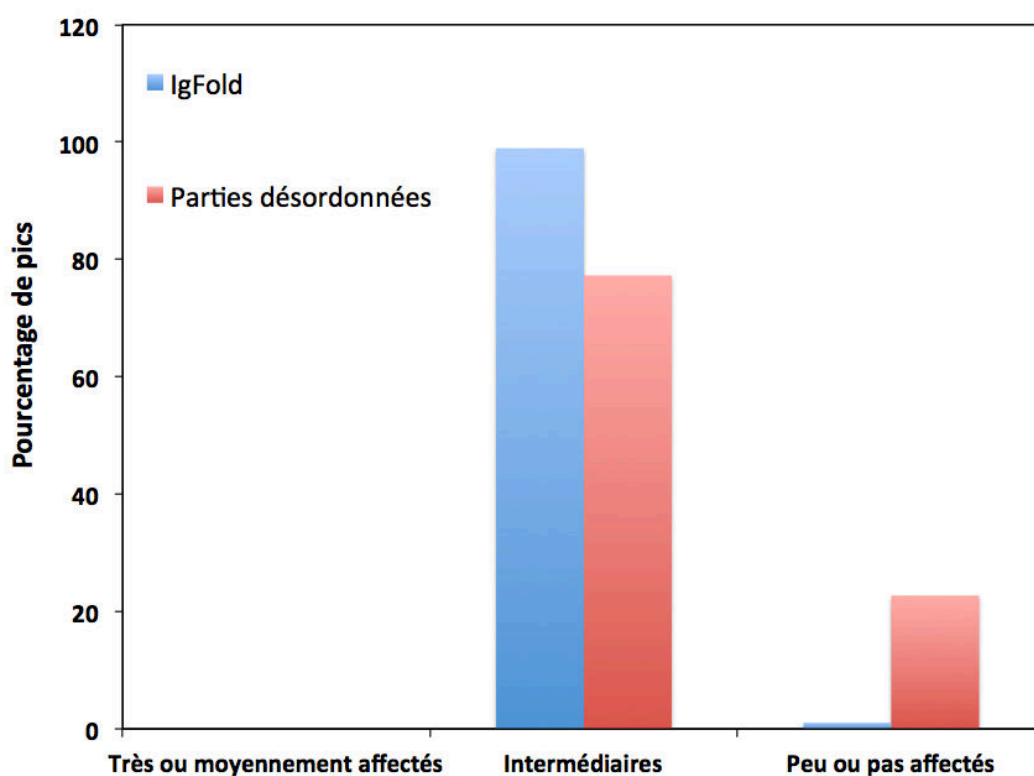


Figure 103 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse

Les ratios d'intensité des résidus de l'IgFold 428-549 (bleu) et des parties désordonnées (rouge) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état Très ou moyennement affectés, Intermédiaires et Peu ou pas affectés.

Les pics les moins affectés (peu ou pas affectés) sont à 80% des pics correspondants à des résidus des régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold 428-549.

La perte considérable de signal (78.7%) observée sur les signaux correspondants à l'IgFold et sur certains signaux correspondants aux régions désordonnées suggère que l'émerine interagit avec la lamine A 423-566. De plus, et contrairement à l'expérience d'interaction avec la longue lamine A 389-646, les échantillons correspondants aux tubes de RMN de l'interaction entre l'IgFold 423-566 et l'émerine (complexes) étaient précipités à la fin de l'expérience. Ces échantillons ont donc été centrifugés à 13 000 rpm et les surnageants et culots ont été déposés sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 104).

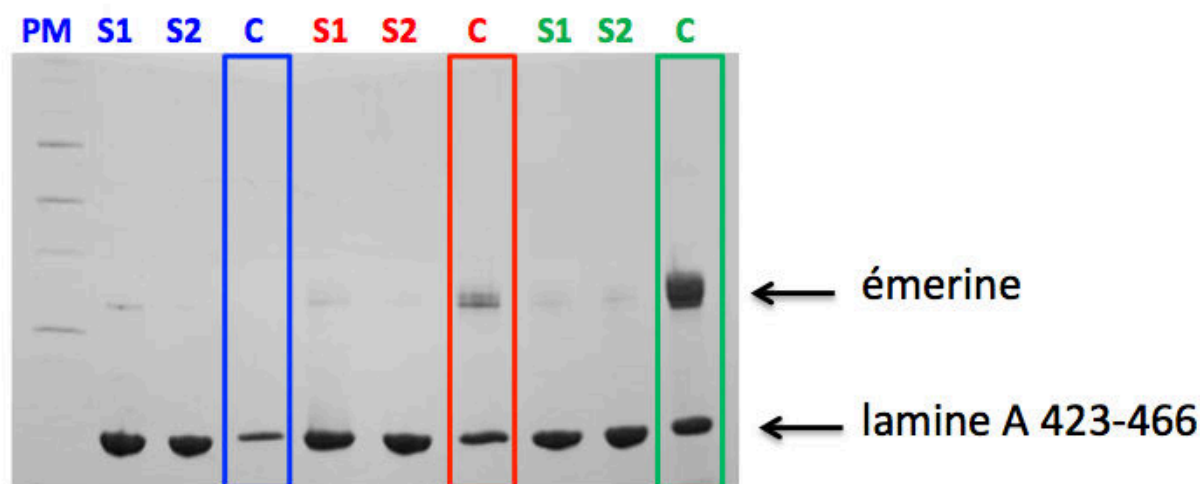


Figure 104 : Gel SDS-PAGE de l'interaction émerine en sortie de dialyse / lamine A 423-566 par RMN

Les couleurs correspondent aux différents spectres HSQCs de la figure précédente. S et C correspondent respectivement aux surnageant et culot.

La lamine A 423-566 est entraînée dans le culot avec l'émerine. Ce qui n'était pas le cas pour la construction longue de lamine A 389-646 (Figure 101). La première hypothèse serait que la présence des parties désordonnées de part et d'autre de l'IgFold 428-549 (389-427 et 550-646), protège l'IgFold d'une précipitation/agrégation non spécifique en présence d'émerine. Il est à noter que notre deuxième expérience est réalisée dans 30 mM NaCl et en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (10X, Roche), alors que la première expérience était réalisée avec 100 mM NaCl et sans inhibiteurs. Il est donc possible que la présence de ce cocktail d'inhibiteur à forte concentration ait également pu faire précipiter les protéines de manière non spécifique.

J'ai donc décidé de reproduire cette même interaction (émerine en sortie de dialyse – lamine A 423-566), en présence d'une quantité raisonnable d'inhibiteurs de protéases (1X, Roche) (Figure 105).

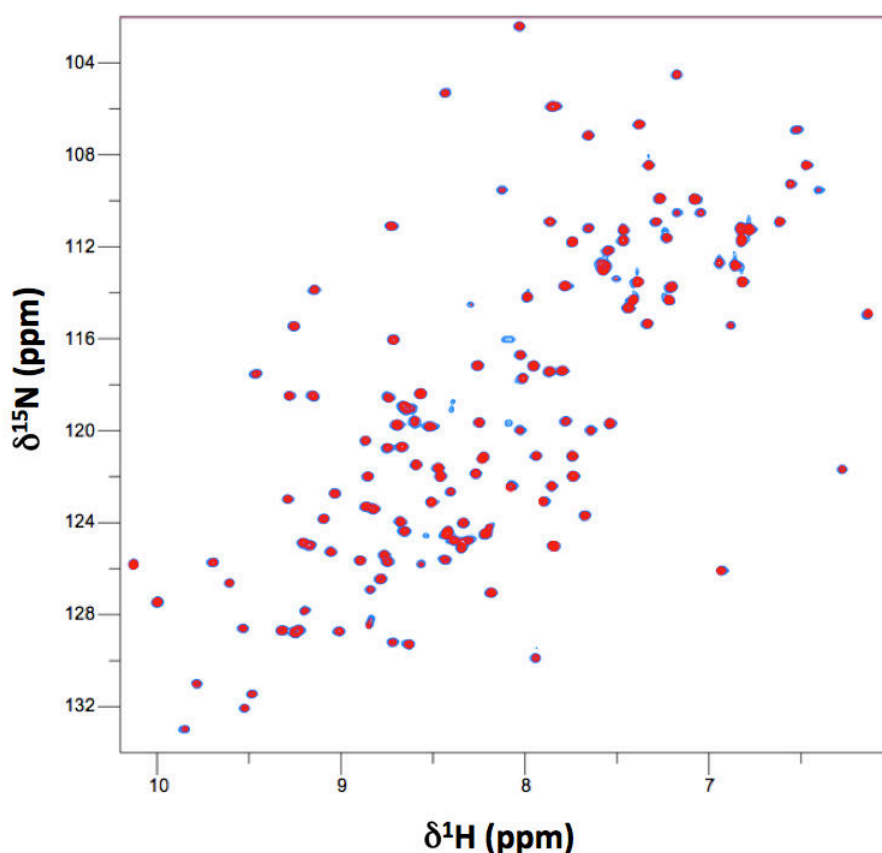


Figure 105 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN n°2

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQC de la lamine A 423-566 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence de 100 μM d'oligomères d'émerine 1-187 (rouge). Tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl, et 10 mM β -mercaptoéthanol.

De la même manière que précédemment, j'ai attribué sur mon spectre de la lamine A 423-566 les pics de l'IgFold 428-549 (PDB : 1IVT). J'ai considéré les autres pics comme étant les 22 pics faisant partie des régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold (423-427 et 550-566). J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic de la lamine A 389-646 après contact avec l'émerine en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 – 566) – émerine}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 – 566) seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, $m = 45.0$ et $\sigma = 6.2$. Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 423-566 de 55.0 % en présence d'émerine.

Cette perte de signal (55.0%), plus faible qu'en présence de 10X d'inhibiteurs de protéases (78.3%), suggère que la présence de ces inhibiteurs en excès induit une précipitation/agrégation non spécifique de ces protéines. En effet, pour cette expérience les échantillons sont limpides.

J'ai défini les pics peu ou pas affectés, intermédiaires, et moyennement et très affectés de la manière suivante :

Pas ou pas affectés	=>	$R < m - \sigma$
Intermédiaires	=>	$m - \sigma < R < m + \sigma$
Moyennement ou très affectés	=>	$m + \sigma < R$

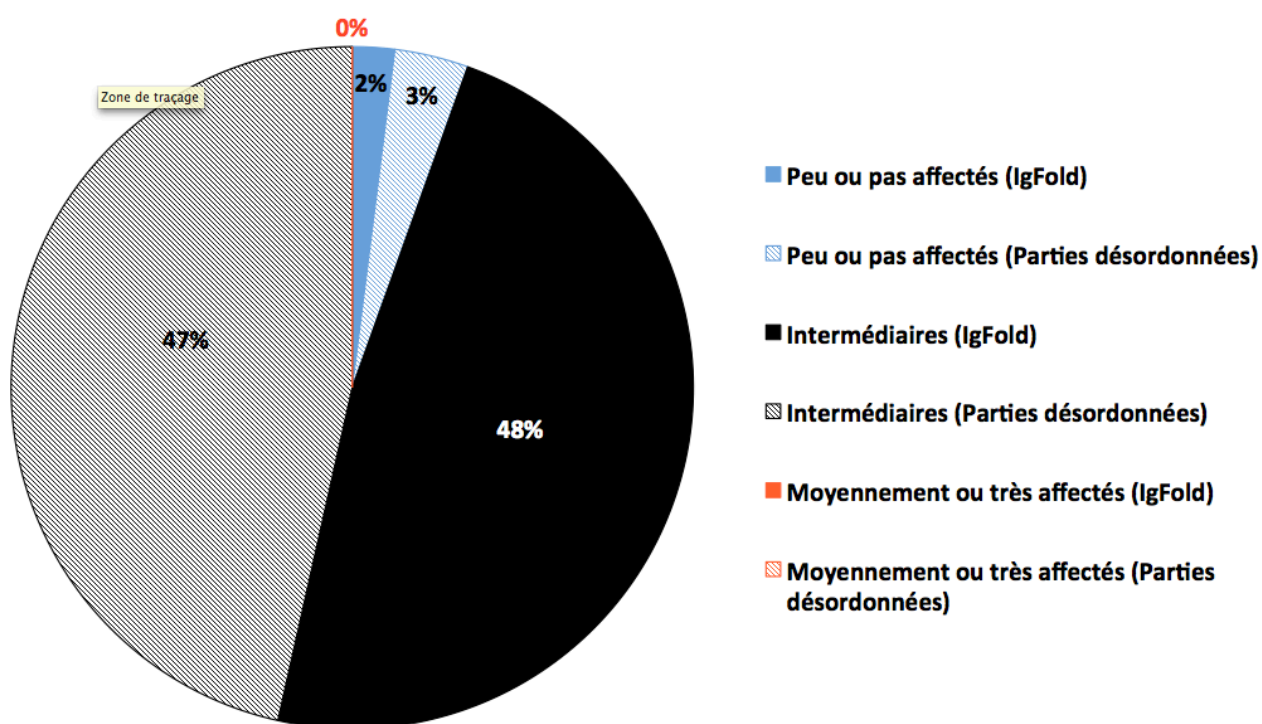


Figure 106 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse n°2

Les ratios d'intensité des résidus de l'IgFold 428-549 (en couleur pleine) et des parties désordonnées (en couleur hachurée) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état ; Peu ou pas affectés (bleu), Intermédiaires (noir) et Moyennement ou très affectés (orange).

Sur la Figure 106 on observe :

- 0% des pics de la lamine A 423-566 sont **moyennement ou très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 61.2%).
- 95% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 48.8 et 61.2%). La moitié de ces pics correspond à des résidus de l'IgFold (428-549) et l'autre moitié aux parties désordonnées.
- 5% sont **peu ou pas affectés** (diminution d'intensité inférieure à 48.8%) et ces pics correspondent à parts égales à l'IgFold et aux parties désordonnées.

Malgré la perte d'intensité de 55% des pics de l'HSQC de la lamine A 423-566 après ajout d'émerine en sortie de dialyse, il est difficile de déterminer quels résidus de la lamine A sont particulièrement affectés par l'interaction. Après 6 jours à 20°C, une HSQC de l'échantillon du complexe a été réalisée. Si je compare l'HSQC de la lamine A 423-566 seule (à $t = 0$) et l'HSQC du complexe lamine A 423-566 – émerine ($t = 6$ jours), j'obtiens la superposition en Figure 107.

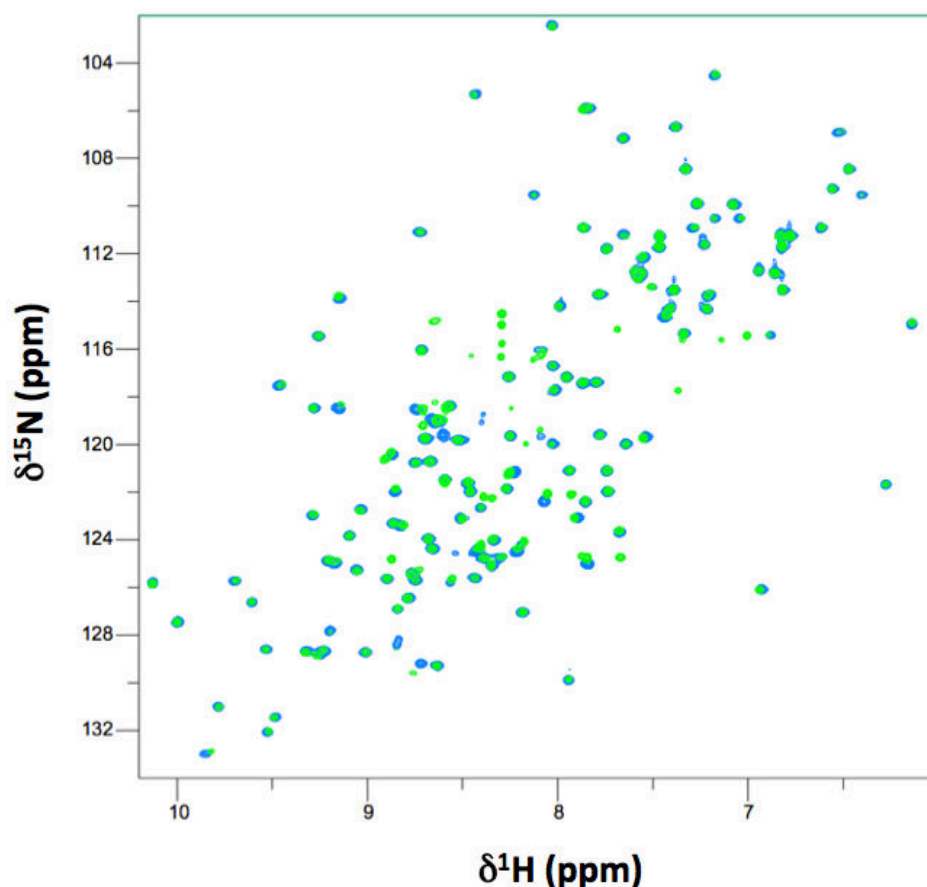


Figure 107 : Interaction émerine sortant de dialyse / lamine A 423-566 par RMN n°2 après 6 jours

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 423-566 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence de 100 μM d'émerine 1-187 en sortie de dialyse après 6 jours à 20°C (vert). Tampon 20 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl et 1 mM β -mercaptoéthanol.

Dans cette expérience deux phénomènes sont observés ; certains pics voient leur intensité diminuer au contact de l'émerine et certains pics subissent une modification de déplacement chimique ($\delta^1\text{H}$ et $\delta^{15}\text{N}$) caractérisée par un déplacement de la position du pic sur l'HSQC. J'ai donc analysé cette expérience de deux manières, premièrement en calculant les variations d'intensité puis en analysant les déplacements de ces pics.

J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic de la lamine A 389-646 après contact avec l'émerine au bout de 6 jours, en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 – 566) – émerine après 6 jours}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A (423 – 566) seule}}$$

J'ai calculé les R de chaque pic de l'HSQC, ainsi que la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, m = 36.0 et σ = 11.4. Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 423-566 de 64.0 % en présence d'émerine après 6 jours à 20°C. La perte de signal après 6 jours (64.0%) est un peu plus importante qu'à t = 0 (55.0%) et suggère soit une interaction soit une précipitation/agrégation de l'échantillon.

J'ai défini les pics peu ou pas affectés, intermédiaires et moyennement et très affectés de la manière suivante :

Pas ou pas affectés	=>	$R < m - \sigma$
Intermédiaires	=>	$m - \sigma < R < m + \sigma$
Moyennement ou très affectés	=>	$m + \sigma < R$

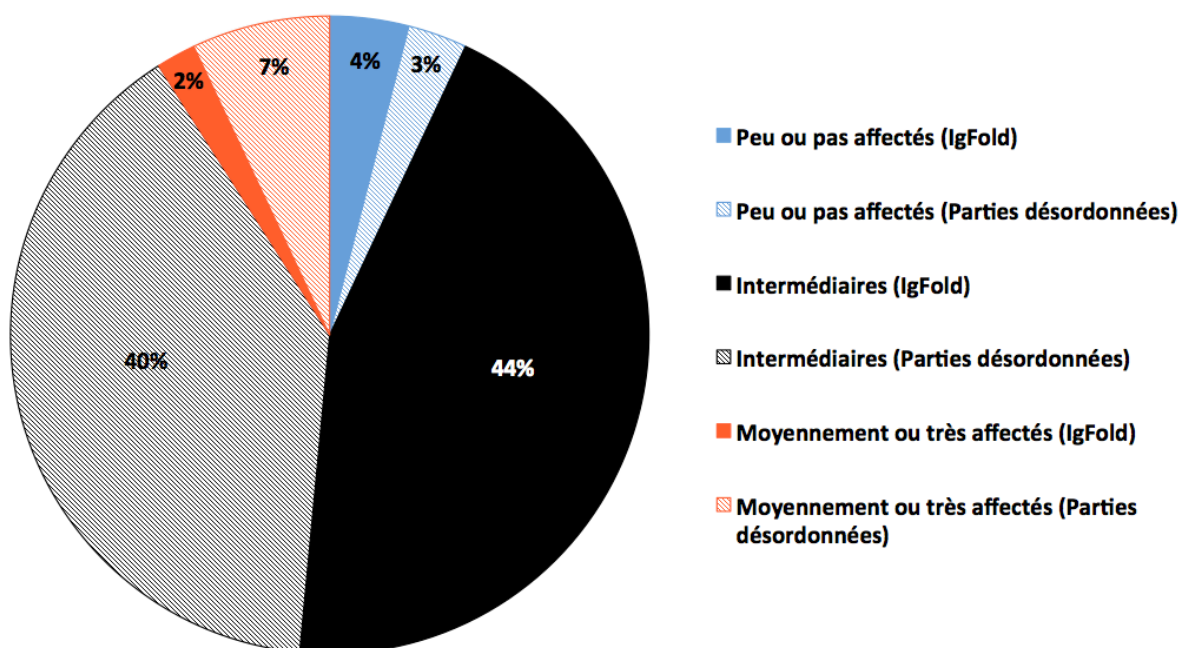


Figure 108 : Résidus de la lamine A 423-566 impliqués dans l'interaction avec l'émerine sortant de dialyse n°2 après 6 jours

Les ratios d'intensité des résidus de l'IgFold 428-549 (en couleur pleine) et des parties désordonnées (en couleur hachurée) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état ; Peu ou pas affectés (bleu), Intermédiaires (noir) et Moyennement ou très affectés (orange).

Sur la Figure 108 on observe :

- 9% des pics de la lamine A 423-566 sont **moyennement ou très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 75.4%). La majorité de ces pics (78%) correspond à des résidus des parties désordonnées de la lamine A (423-427 et 550-646).
- 84% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 52.6 et 75.4%).
- 7% sont **peu ou pas affectés** (diminution d'intensité inférieure à 52.6%).

Je ne possède pas l'attribution complète des signaux RMN du domaine 423-566, mais uniquement celle des signaux de l'IgFold 428-549 (PDB : 1IVT). J'ai donc pu calculer les ratios d'intensité de chaque pic (du spectre HSQC de la lamine A 423-566) correspondant à un résidu de l'IgFold (428-549), avec/sans émerine. Ces ratios sont présentés en Figure 109.

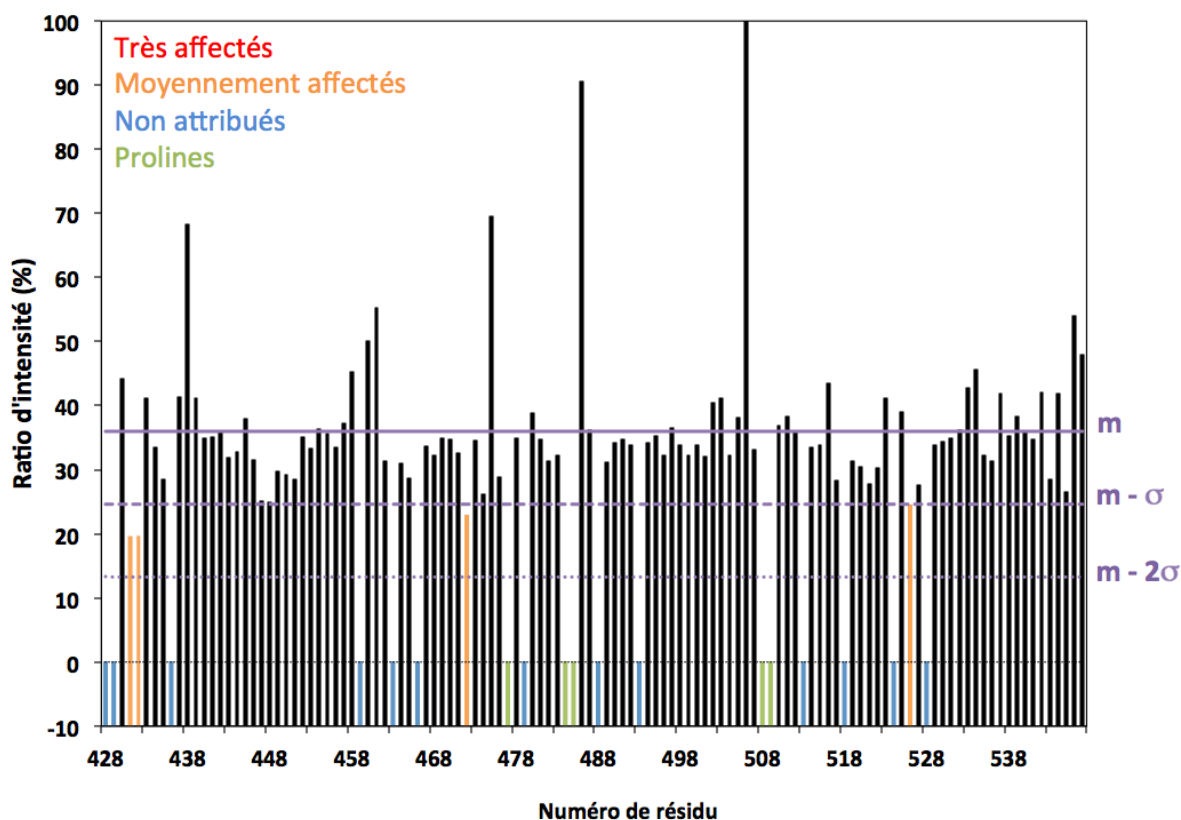


Figure 109 : Ratio d'intensité pour chaque pic de l'IgFold de l'expérience RMN d'interaction entre la lamine A 423-566 et l'émerine en sortie de dialyse

Les ratios sont calculés en prenant l'intensité du pic sur le spectre de la lamine A 423-566 en présence d'émerine divisée par l'intensité du pic sur le spectre de la lamine A seule. Les pics non attribués sont représentés en bleu ou en vert dans le cas des prolines. Les résidus très affectés sont en rouge et les résidus moyennement affectés en orange.

Alors que pour la première expérience (à $t = 0$), aucun résidu de la lamine A ne semble être affecté par la présence d'émerine, après 6 jours à 20°C, certains pics de l'IgFold voient leurs intensités diminuer de façon significative en présence d'émerine (Figure 109). Aucun résidu n'est très affecté (diminution d'intensité de plus de 86.8%) mais 4 résidus de l'IgFold sont moyennement affectés avec une diminution d'intensité entre 75.4 et 86.8% en présence d'émerine. Ces résidus sont S431, Q432, Q472 et L526.

J'ai ensuite analysé les perturbations de déplacement chimique (CSP : Chemical shift perturbation) de chaque pic correspondant à l'IgFold 428-549.

$$CSP = \sqrt{\frac{1}{2} [\Delta\delta_H^2 + (6.5 \times \Delta\delta_N^2)]}$$

Avec $\Delta\delta_H = \delta_H$ sur le spectre du complexe – δ_H sur le spectre de la lamine seule

Et $\Delta\delta_N = \delta_N$ sur le spectre du complexe – δ_N sur le spectre de la lamine seule

J'ai ensuite calculé la moyenne et l'écart type de ces CSPs : $m = 0.013$ et $\sigma = 0.021$.

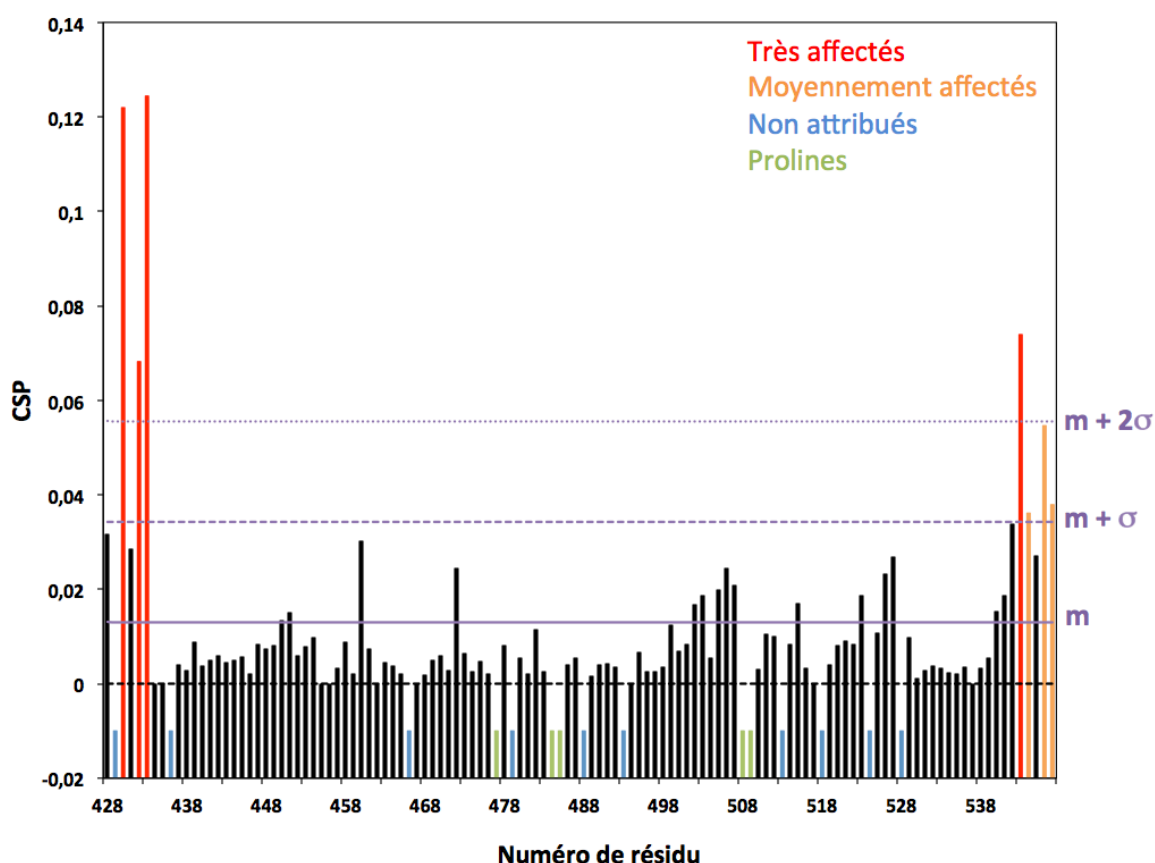


Figure 110 : Analyse des perturbations de déplacement chimique pour l'interaction lamine A 423-566 / émerine en sortie de dialyse après 6 jours

Les CSPs sont calculés en utilisant la formule mathématique présentée plus haut. Les pics non attribués sont représentés en bleu ou en vert dans le cas des prolines. Les résidus très affectés sont en rouge et les résidus moyennement affectés en orange. Les lignes violettes correspondent à la valeur de la moyenne (m), la moyenne + un écart type ($m + \sigma$) et la moyenne + 2 écarts type ($m + 2\sigma$).

Quatre résidus de l'IgFold sont très affectés (perturbation de leur déplacement chimique de plus de $m + 2\sigma$) et 3 résidus sont moyennement affectés (perturbation de leur déplacement chimique de plus de $m + \sigma$) en présence d'émerine. Ces résidus sont F430, Q432, H433 et L543 et V544, S546 et V547 respectivement.

J'ai cartographié les résidus de la lamine A 423-566 les plus affectés par la présence d'émerine (diminution de leur intensité de plus de 75.4% ou perturbation de leur déplacement chimique de plus de $m + \sigma$) sur la structure connue de l'IgFold 428-549 [Figure 111](#).

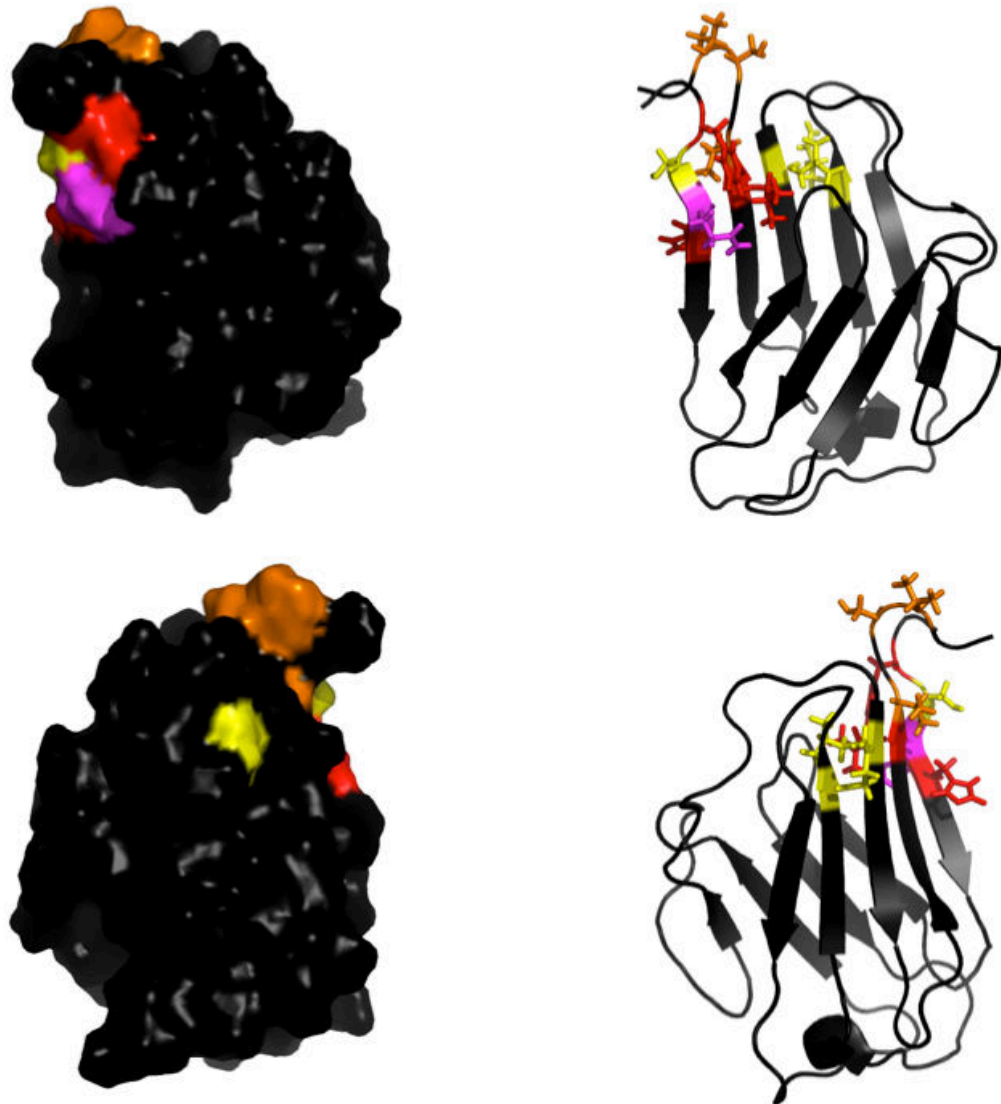


Figure 111 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'émerine après 6 jours

Vue de la structure PDB du domaine IgFold 428-549 de la lamine A en représentation surface et cartoon, chacune également représentée après une rotation de 180°. Les résidus de l'IgFold 429-548 (PDB : 1IVT) sont représentés en noir. Les résidus dont les pics correspondants voient **leur intensité moyennement ou très affectés par la présence d'émerine** sont représentés en **jaune** (S431, Q472 et L526) et les résidus dont les pics ont déplacement chimique perturbé par la présence d'émerine sont représentés en **rouge pour les très affectés** (F430, H433 et L543) et en **orange pour les moyennement affectés** (V544, S546 et V547). Le résidu représenté en magenta est **Q432** dont le pic correspondant voit à la fois **son intensité et son déplacement chimique affectés par la présence d'émerine**.

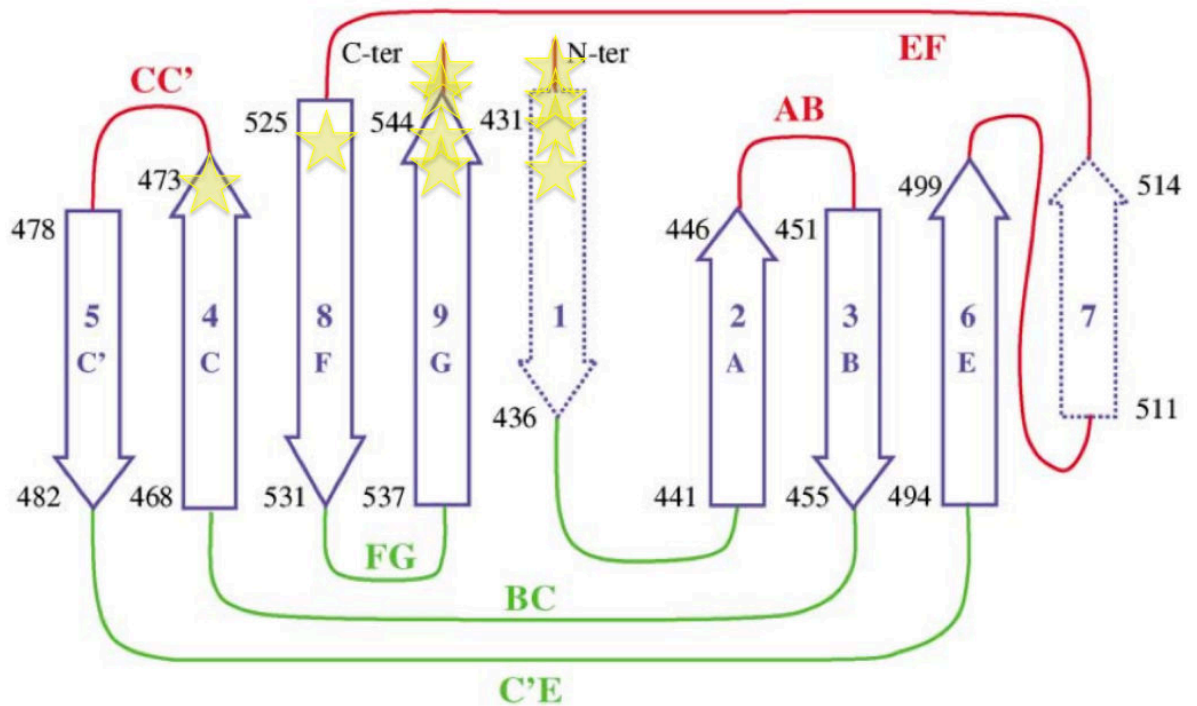


Figure 112 : Topologie du domaine IgFold de la lamine A en interaction avec l'émerine. Adapté de ³⁰

Les brins β appartenant aux deux feuillets β sont représentés par des flèches violettes. Leurs limites sont indiquées par les positions des résidus aux deux extrémités de chaque flèche. Les feuillets représentés par des flèches en pointillés sont spécifiques de l'IgFold de la lamine A, alors que les autres sont retrouvés dans toutes les structures de type immunoglobuline. Les boucles situées du côté des extrémités N et C-terminales sont représentées en rouge et les boucles situées à l'opposé sont représentées en vert. Les résidus observés comme étant affectés par la présence d'émerine sont représentés par des étoiles jaunes.

La première observation est que tous les résidus affectés sont localisés sur une face spécifique de l'IgFold du côté N et C-terminal de la protéine.

Par ailleurs aucun de ces résidus n'a été montré muté chez des patients atteints de laminopathies.

Si je compare les spectres HSQCs du complexe Lamine A 423-566 – émerine à $t = 0$ et Lamine A 423-566 – émerine à $t = 6$ jours, j'observe l'apparition de nombreux signaux RMN (Figure 113).

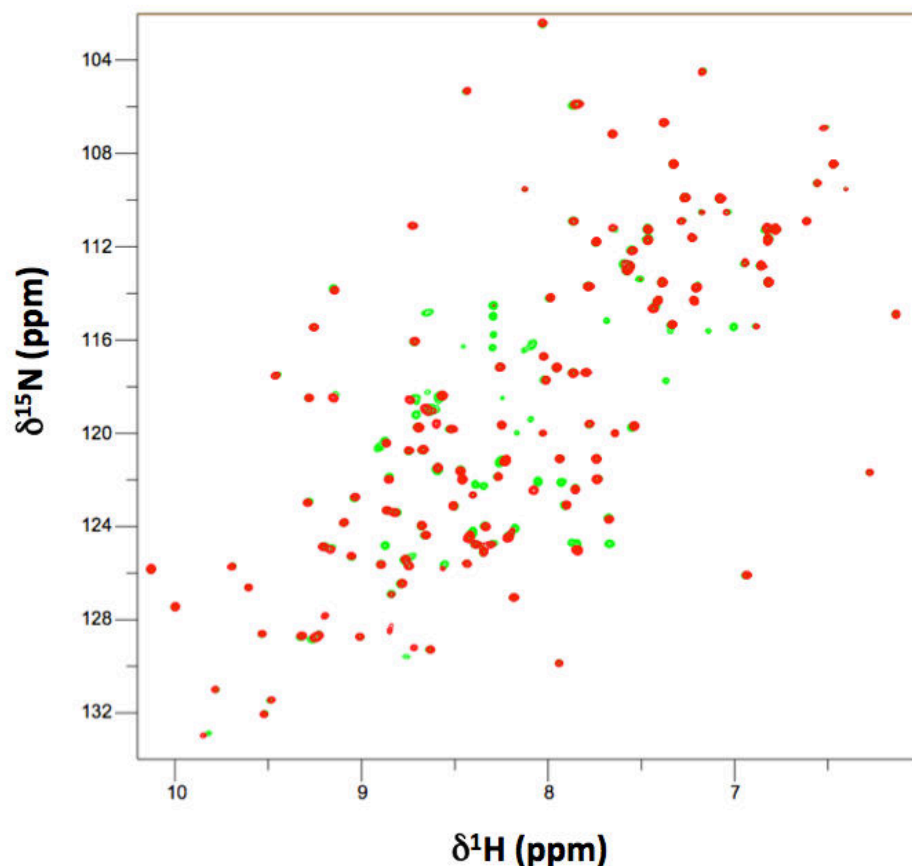


Figure 113 : Évolution de l'échantillon RMN émerine / lamine A 423-566 après 6 jours

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 423-566 marquée ^{15}N à $100\ \mu\text{M}$ en présence de $100\ \mu\text{M}$ d'émerine 1-187 en sortie de dialyse. Le spectre rouge correspond à l'expérience réalisée à $t = 0$ et le spectre vert correspond à l'expérience réalisée à $t = 6$ jours. Tampon : $20\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 8, $30\ \text{mM}$ NaCl et $1\ \text{mM}$ β -mercaptoéthanol.

Les pics apparaissant sur le spectre HSQC de la lamine A 423-566 après 6 jours au contact de l'émerine ont des signaux protons correspondant à des résidus désordonnés. Étant donné que W514 et L526, importants pour la stabilisation de la structure en sandwich β de l'IgFold sont impliqués dans l'interaction avec l'émerine, on peut imaginer que l'IgFold en présence d'émerine subit un dépliement partiel. La raison pour laquelle cet effet n'est observé que plusieurs jours après une incubation à 20°C est toujours inconnue. Il se pourrait que l'IgFold n'interagisse qu'avec des oligomères d'émerine particuliers et que donc une incubation de quelques jours à 20°C soit nécessaire pour obtenir ces oligomères et donc une interaction. Tous ces résultats RMN demandent à être reproduits et validés par d'autres méthodes.

J'ai décidé de tester l'interaction entre l'émerine sortant de dialyse et conservée à 20°C et la lamine A 423-566 par d'autres techniques, et notamment par titration calorimétrique isotherme. Cette interaction a été testée après différents temps d'incubation à 20°C (6h, 12h et 27h). Seule l'expérience après 27h d'incubation de l'émerine à 200 µM à 20°C a montré une interaction entre l'émerine et la lamine A 423-566 (Figure 114).

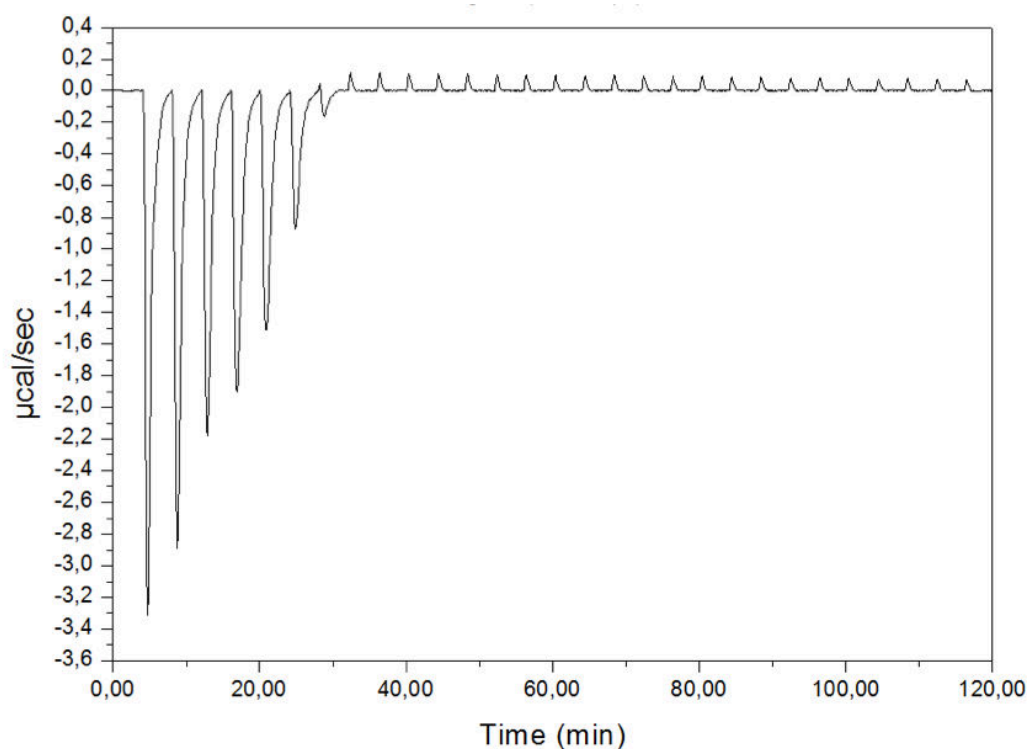


Figure 114 : Interaction émerine en sortie de dialyse / lamine A 423-566 par ITC

Graphe de l'expérience ITC réalisée par injections successives de 10 µL d'un échantillon d'émerine (à 200 µM dans un tampon 20 mM Tris-HCl, pH 8 et 30 mM NaCl) sur un échantillon de lamine A 432-566 (à 20 µM dans un tampon 20 mM Tris-HCl, pH 8, 30 mM NaCl et 1 mM β-mercaptoéthanol). Les échantillons d'émerine et de lamine ont été conservés après purification et avant ITC, pendant 27 heures à 20°C.

J'observe une interaction et après analyse j'obtiens une affinité d'environ 100 nM, une stoechiométrie de 0.33, une variation d'enthalpie ΔH de -8.7×10^4 Joules et une variation d'entropie ΔS de -266 Joules/K⁻¹. La stoechiométrie de 0.33 indiquerait qu'une molécule d'émerine interagit avec 3 molécules de lamine A 423-566. La variation d'enthalpie de la réaction est très négative et est due à une interaction de type exothermique (dégagement de chaleur) comme la majorité des interactions protéine-protéine. Enfin la variation d'entropie (ΔS) est également négative, suggérant une réduction du degré conformationnel (rotationnel et vibrationnel) des protéines après interaction.

L'interaction émerine – lamine A a également été étudiée par nos collaborateurs, l'équipe du Dr B. Buendia à l'université Paris Diderot, par PLA. Ils ont ainsi pu tester les interactions entre les lamines A/C endogènes et l'émerine WT ou ses mutants X-EDMD (Figure 115).

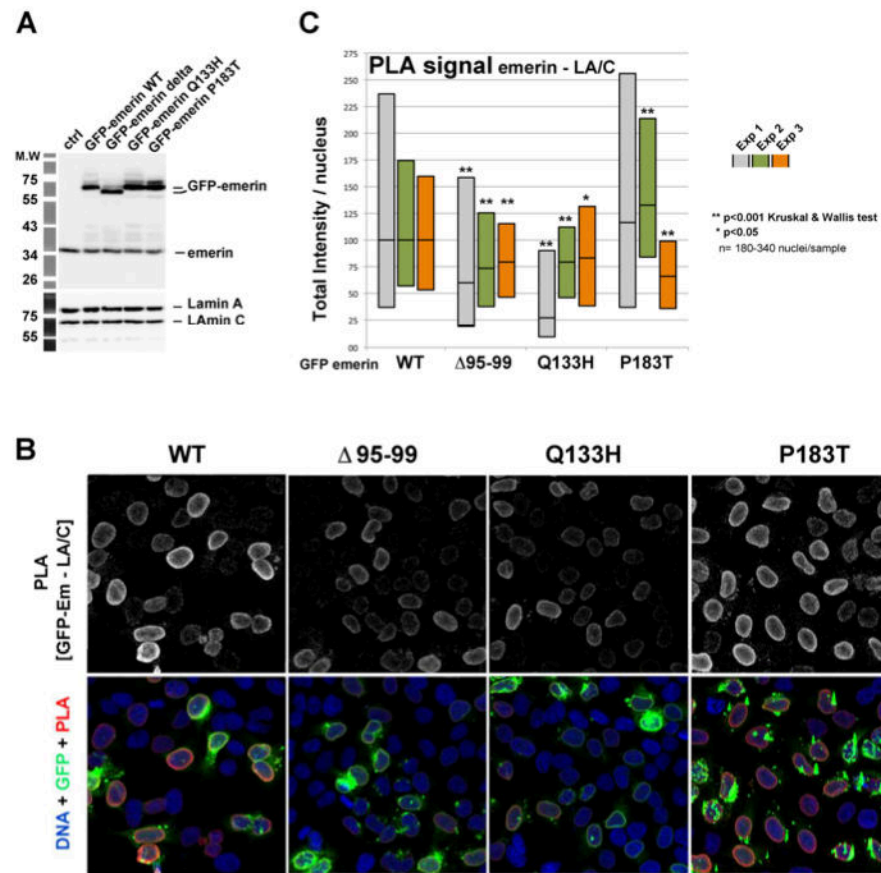


Figure 115 : PLA émerine-lamine A/C sur le WT et les mutants X-EDMD dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 1 plasmide codant pour GFP-émerine (WT ou mutée). Les émerines testées sont le WT, Del95-99, Q133H et P183T. La détection se fait d'abord par ajout d'anticorps primaires (anticorps de souris anti-GFP et anticorps de lapin anti lamines A/C) puis par des anticorps secondaires Duolink couplés à des oligonucléotides (PLA probe anti-mouse minus et PLA probe anti-rabbit plus). Les réactifs de détection Duolink sont ensuite ajoutés, permettant d'observer un point rouge chaque fois que les 2 anticorps secondaires plus et moins sont proches dans l'espace.

Des proximités émerine-lamine A/C endogènes sont observées à la périphérie nucléaire pour le WT, confirmant une interaction émerine – lamine A/C en cellule. Les mutants Del95-99 et Q133H sont significativement moins souvent proches que le WT des lamines de type A dans les cellules. Pour le mutant P183T, il est difficile de conclure sur ses proximités avec les lamines A/C car il a tendance à s'agréger en foyers dans le réticulum endoplasmique et donc il n'est pas toujours correctement localisé à la périphérie nucléaire. La corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* sur l'assemblage de l'émerine et *in vivo* sur les proximités émerine-lamines A/C suggère que l'auto-association de l'émerine est nécessaire à son interaction avec la lamine A.

Bilan des interactions émerine – lamine A

L'interaction émerine – lamine A a été observée de nombreuses fois dans la littérature par différentes techniques^{207, 208, 209}, délimitant les domaines d'interaction aux régions 70-164 de l'émerine (région nucléoplasmique) et 384-664 de la lamine A (domaine queue en C-terminal de la protéine). Après avoir confirmé des proximités émerine – lamine A endogène en cellule par des expériences de PLA, j'ai montré que les monomères d'émerine 1-187 n'étaient pas capables d'interagir avec la lamine A 389-646 *in vitro*.

Les seules interactions entre émerine et lamine A ont été observées sur l'émerine sortant de dialyse et après plusieurs jours à 20°C, contenant probablement différents états oligomériques (monomères, dimères et oligomères de plus haut poids moléculaire).

Les interactions observées semblent mettre en jeu le domaine structuré (428-549) de la queue des lamines et plus particulièrement les résidus F430, S431, Q432, H433, Q472, L526, L543 V544, S546 et V547. Tous ces résidus sont localisés sur une surface bien définie, du côté N et C-terminal du domaine IgFold.

Après 6 jours à 20°C, des pics supplémentaires apparaissent sur le spectre RMN de la lamine A 423-566 (en contact avec l'émerine) et semblent correspondre à des résidus nouvellement désordonnés. Il est possible que la présence d'une interaction émerine-lamine A induise un dépliement partiel de l'IgFold.

IV. ETUDES D'AUTRES INTERACTIONS PROTÉINE-PROTÉINE À L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE, IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE AU STRESS MÉCANIQUE

IV.1. LES INTERACTIONS IMPLIQUANT L'ACTINE

L'actine est un acteur majeur de la réponse de la cellule à un stress mécanique, tout comme l'émerine et la lamine A, et sa polymérisation est altérée dans des cellules déficientes en lamine de type A ou tout simplement possédant une lamine A mutée ¹⁵⁸. Il est possible qu'une interaction entre l'actine et la lamine A soit la raison pour laquelle des défauts dans les lamines de type A causent une dérégulation de la polymérisation de l'actine. Une autre hypothèse serait que cette dérégulation soit liée à une mauvaise localisation de l'émerine due aux mutations ou à la perte de la lamine A. En effet, il a été montré que l'émerine nécessite la présence de la lamine A pour être correctement localisée, et interagit avec l'actine nucléaire sur son extrémité pointue afin d'en favoriser la polymérisation ¹⁵⁹. Je présenterai dans ce chapitre mes tests d'interactions entre l'actine et le domaine queue de la lamine A d'une part et entre l'actine et l'émerine 1-187 d'autre part.

IV.1.1. L'interaction actine – lamine A

J'ai testé l'interaction actine – lamine A *in vitro* par RMN, en utilisant deux constructions de lamine A : 389-646 (queue C-terminale, Figure 116A) et 411-553 (IgFold, Figure 116B) et de l'actine G purifiée et fournie par Louis Renault au LEBS, CNRS de Gif-sur-Yvette. Comme l'actine G (monomérique) est très sensible aux changements de tampon et à la concentration, j'ai dû utiliser un tampon spécifique, dans avoir lequel je suis sûre de ne pas d'actine polymérisée (actine F). Il est composé de 5 mM de Tris-HCl pH 7.8, 100 μ M de CaCl_2 , 200 μ M d'ATP et 1 mM de DTT.

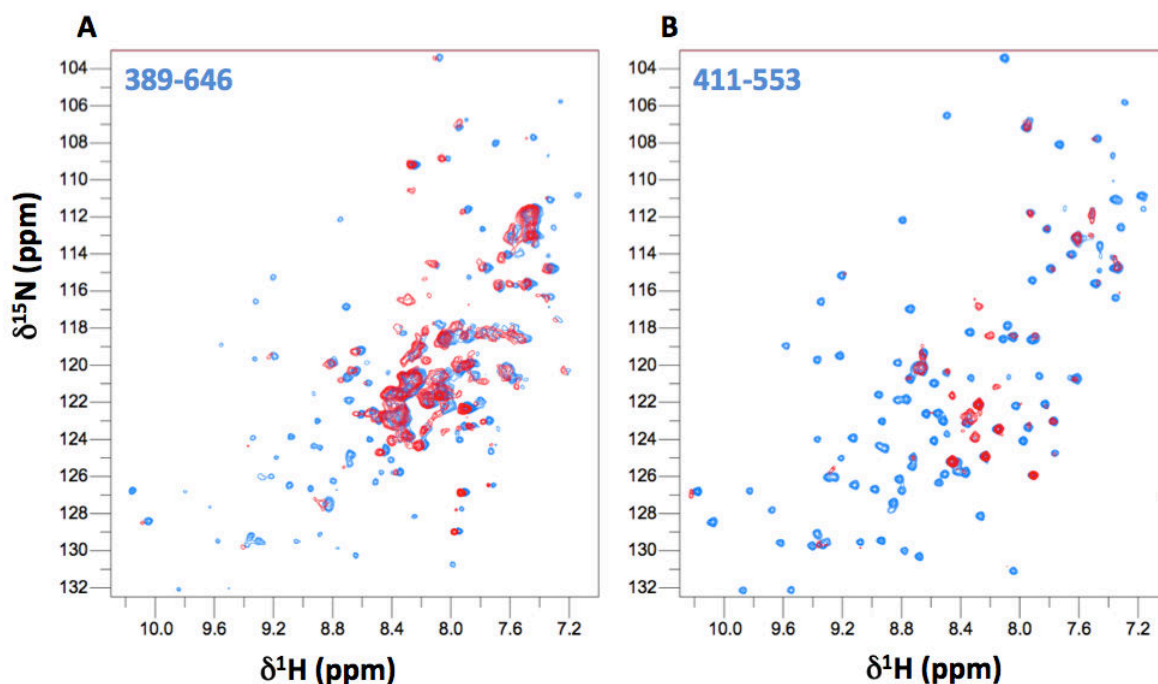


Figure 116 : Interaction actine G – lamine A par RMN

A. Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 389-646 marquée ^{15}N à 32.3 μ M seule (bleu) ou en présence de 32.6 μ M d'actine G (en rouge). B. Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 411-553 marquée ^{15}N à 32.8 μ M seule (bleu) ou en présence de 32.6 μ M d'actine G (en rouge). Tampon : 5 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 μ M CaCl_2 , 200 μ M ATP et 1 mM DTT.

J'observe une interaction entre l'actine et les deux constructions de lamine A testées. J'observe que les pics supplémentaires visibles sur le spectre de la lamine A 389-646 (Figure 116A) comparé au spectre de la lamine A 411-553 (Figure 116B), ne correspondent pas à des résidus impliqués dans l'interaction avec l'actine G et sont toujours présents et avec la même intensité sur les spectres des complexes (rouge). Il semblerait donc que ce soit la région structurée du domaine queue des lamines A soit suffisante pour son interaction avec l'actine.

Pour la deuxième expérience (interaction avec la lamine A 411-553), j'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic après contact avec l'actine G en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A – actine G}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, $m = 28.2$ et $\sigma = 14.1$. Ce qui signifie que la présence d'actine G induit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 411-553 de 71.8%.

Après avoir réalisé un gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 117), j'en ai conclu qu'une majeure partie ($\approx 80\%$) de l'échantillon de lamine A 411-553 précipite dans le tube de RMN avec une partie de l'échantillon d'actine (50%).

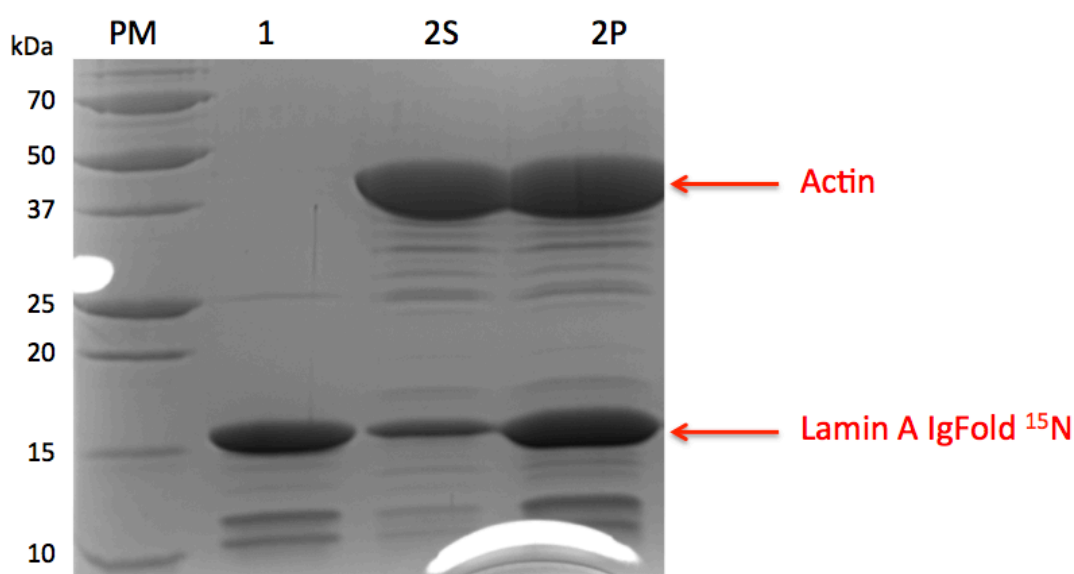


Figure 117 : Gel SDS-PAGE des échantillons RMN de l'interaction lamine A – actine G

PM correspond au marqueur de poids moléculaire. Le puits noté 1 correspond au tube RMN de la lamine A 411-553 seule (spectre HSQC bleu de la Figure 116B) et les puits 2S et 2P correspondent respectivement au surnageant et au culot du tube RMN du complexe lamine A 411-553 – actine G (spectre rouge sur la Figure 116B). La moitié de l'actine G se retrouve dans le culot, entraînant avec elle 80% de la lamine A 411-553.

J'ai ensuite défini les pics peu ou pas affectés, intermédiaires et moyennement ou très affectés de la manière suivante :

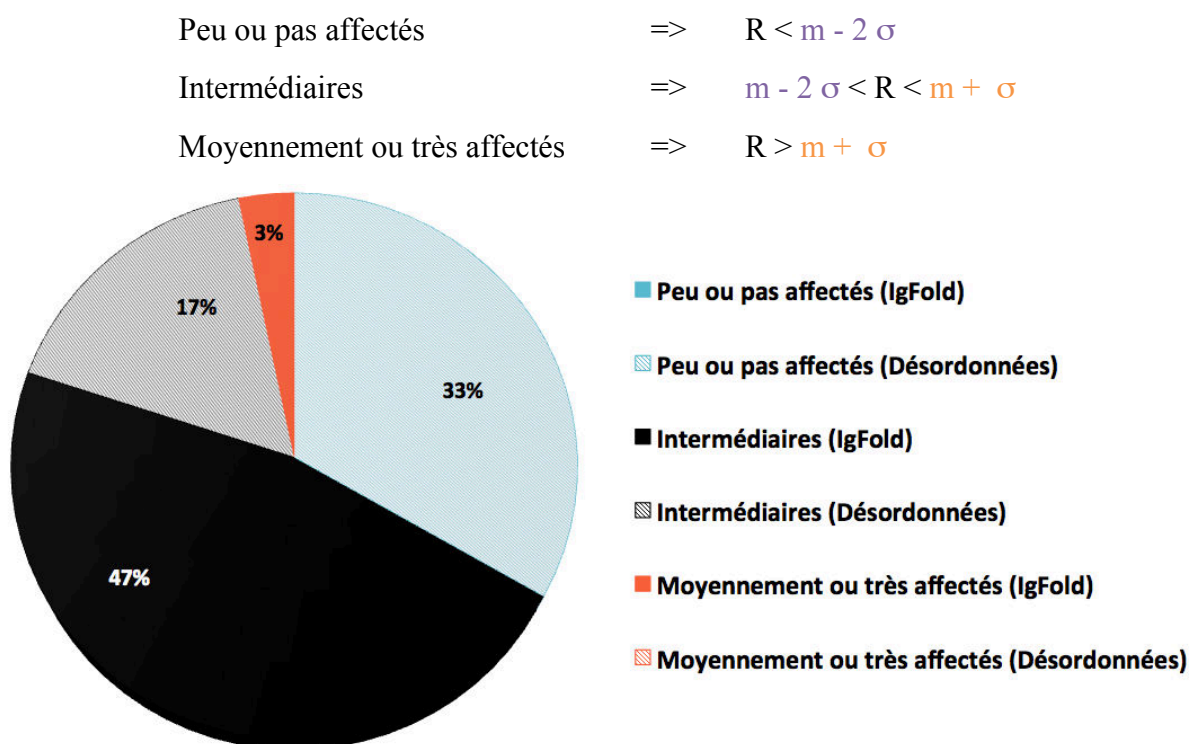


Figure 118 : Répartition des pics de la lamine A 411-553 en fonction de leur comportement dans l'interaction avec l'actine G

Sur la Figure 118, on observe :

- 3% des pics de la lamine A 411-553 sont **moyennement ou très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 100%). Tous ces pics correspondent à des résidus de l'IgFold (428-549).
- 64% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 56.4 et 100%) et 73% de ces pics correspondent à des résidus structurés de l'IgFold.
- 33% sont **peu ou pas affectés** (diminution d'intensité inférieure à 56.4%) et la totalité de ces pics correspond à des résidus des parties désordonnées de la lamine A 411-553. Soit les deux régions 411-427 et 550-554.

J'ai donc cartographié les résidus de la lamine A 411-553 les plus affectés par la présence d'actine G (diminution de leur intensité de plus de 100%) sur la structure connue de l'IgFold 428-549 (Figure 119).

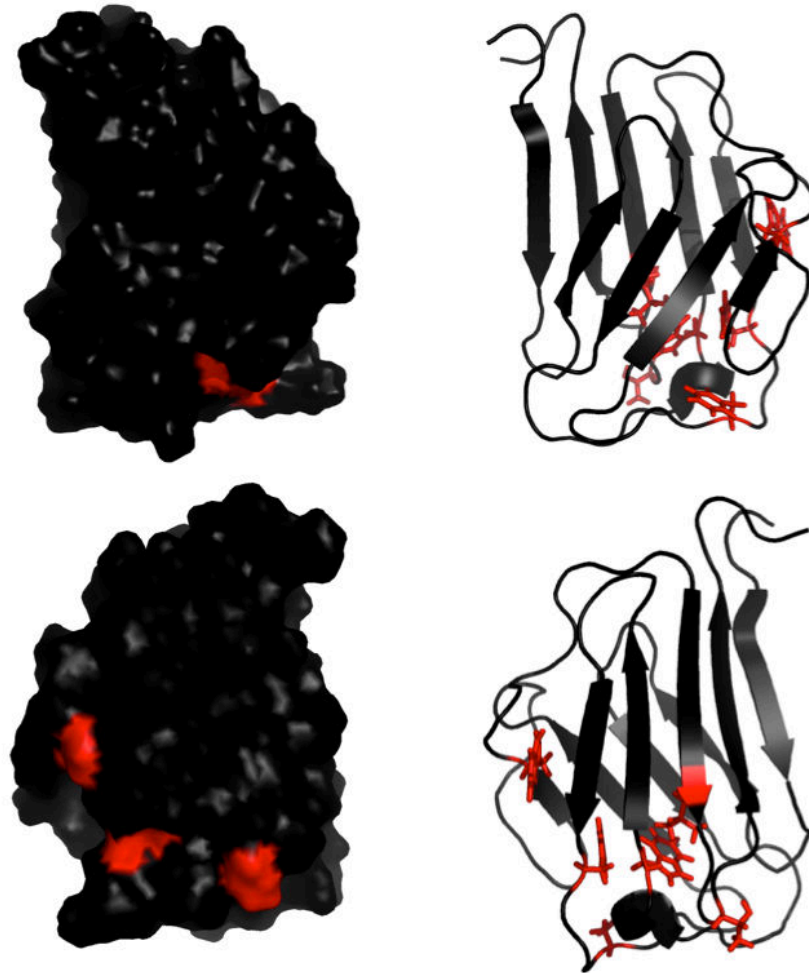


Figure 119 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'actine G

Vue de la structure PDB du domaine IgFold 428-549 de la lamine A en représentation surface et cartoon, chacune également représentée après une rotation de 180°. Les résidus de l'IgFold 429-548 (PDB : 1IIVT) sont représentés en noir. Les résidus affectés par la présence d'actine G (résidus dont les variations d'intensité des pics sur l'HSQC sont les plus importantes entre les HSQCs de la protéine seule et du complexe) sont représentés en rouge. Le reste des résidus (en noir) sont intermédiaires.

Les résidus de la lamine A les plus affectés par la présence de l'actine G sont W467, F483, F487, W514, L530 et T534.

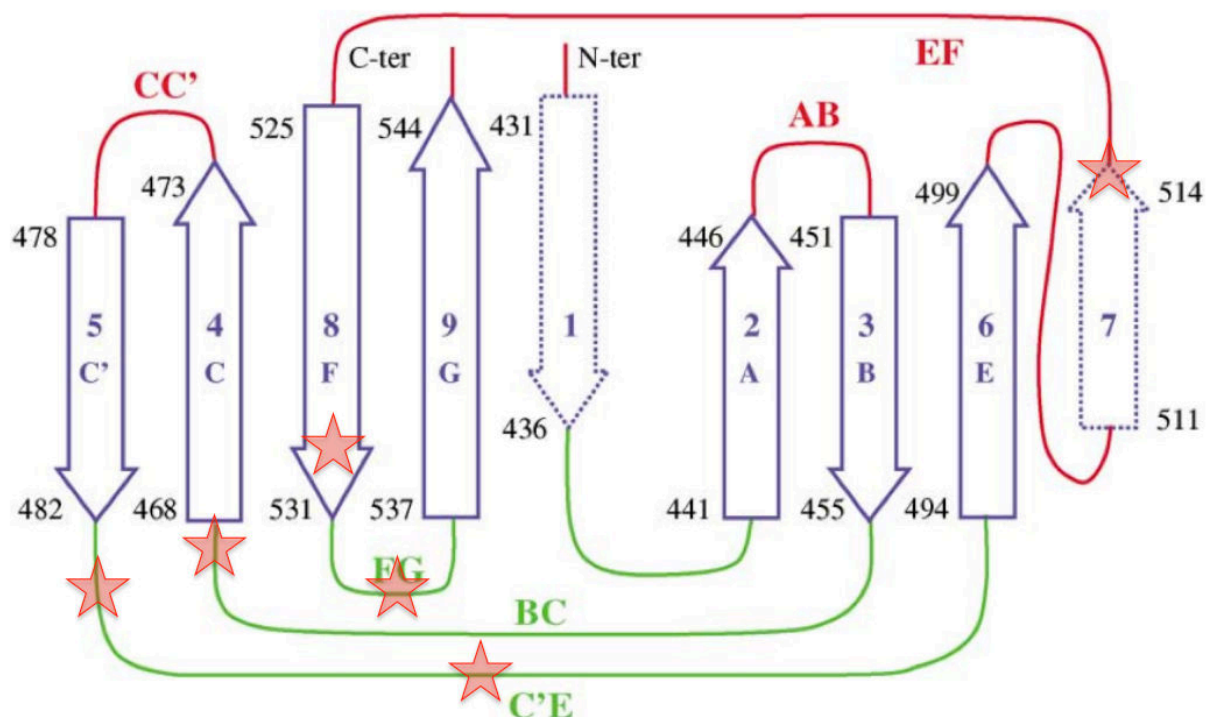


Figure 120 : Topologie du domaine C-terminal de la lamine A en interaction avec l'actine G. Adapté de ³⁰

Les brins β appartenant aux deux feuillets β sont représentés par des flèches violettes. Leurs limites sont indiquées par les positions des résidus aux deux extrémités de chaque flèche. Les feuillets représentés par des flèches en pointillés sont spécifiques de l'IgFold de la lamine A, alors que les autres sont retrouvés dans toutes les structures de type immunoglobuline. Les boucles situées du côté des extrémités N et C-terminales sont représentées en rouge et les boucles situées à l'opposé sont représentées en vert. Les résidus observés comme étant affectés par la présence d'actine G sont représentés par des étoiles rouges.

Les résidus de la lamine A subissant la plus forte variation de déplacement chimique lors de l'interaction avec l'actine G sont localisés sur une région de la structure de l'IgFold, à l'opposé des deux extrémités N et C-terminales de cette construction de lamine A (Figure 120). Parmi les résidus affectés, 1 seul (T534) est un résidu localisé à la surface de la protéine et 5 résidus (W467, F483, F487, W514 et L530) correspondent à des acides aminés enfouis dans la structure de l'IgFold et qui participent au maintien de cette structure IgFold.

Des mutations sur ces résidus ont été retrouvées chez des patients souffrant de différentes laminopathies. Parmi ces mutations, W467R ¹⁸⁶ et L530P ¹⁸⁶ induisent une forte déstabilisation de la structure de l'IgFold et ont été retrouvées chez des patients souffrant de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. Enfin, la mutation W514R a été retrouvée chez des patients souffrant de LGMD1B et entraîne une délocalisation des lamines de type A et des protéines SUN et une augmentation de la sensibilité de la cellule à un stress mécanique ^{185, 187,}

Bilan de l'interaction actine – lamine A

La première observation est que 50% de l'actine G et 80% de la lamine A se retrouvent dans le culot lors de l'interaction. Deux raisons à ce phénomène sont possibles ; soit l'actine G polymérise/s'agrège malgré les précautions de tampon et entraîne une partie de la lamine A au fond du tube de façon non spécifique, soit la lamine A, en interagissant avec l'actine G, favorise sa polymérisation. Des expériences supplémentaires, notamment des essais d'interaction en présence d'inhibiteurs de polymérisation d'actine (comme la Latrunculine A : LatA), ou encore des mesures de l'effet de la présence de lamine A sur la cinétique de polymérisation de l'actine, sont nécessaires pour conclure sur ces hypothèses.

L'interaction observée semble mettre en jeu principalement le domaine structuré (428-549) de la queue des lamines et plus particulièrement les résidus W467, F483, F487, W514, L530 et T534. Tous ces résidus sont localisés sur la région à l'opposé de laquelle se trouvent les deux extrémités N et C-terminales de cette construction de lamine A.

IV.1.2. L'interaction actine – émerine

J'ai, de la même manière, testé l'interaction actine - émerine, *in vitro* par RMN (Figure 121), en utilisant l'émerine 1-187 recombinante et la même actine G purifiée au LEBS (CNRS, Gif-sur-Yvette).

Interaction émerine – actine G :

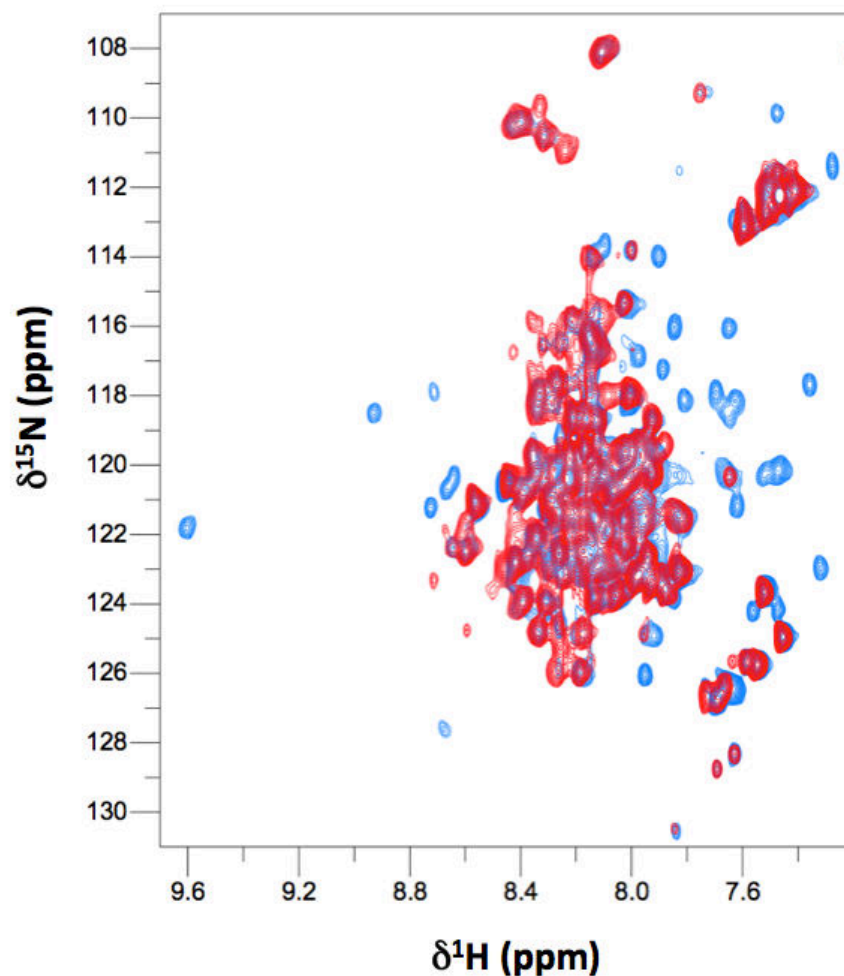


Figure 121 : Interaction émerine-actine G par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de l'émerine 1-187 à 30 μM marquée ^{15}N seule (bleu) ou en présence d'1 équivalent d'actine G (rouge). Les HSQCs à 0.25 ; 0.5 et 0.75 équivalents ont également été enregistrés. Tampon : 5 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 μM CaCl_2 , 200 μM ATP et 1 mM DTT.

J'ai considéré que les pics correspondants aux régions désordonnées de la protéine avaient des déplacements chimiques proton ($\delta^1\text{H}$) compris entre 7.8 et 8.6 ppm et que les autres pics correspondaient aux résidus du domaine LEM.

J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic après contact avec l'actine G en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre émerine - actine G}}{\text{Intensité sur le spectre émerine seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, $m = 91.4$ et $\sigma = 22.9$. Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de l'émerine de 8.6 % en présence d'actine G.

Je définis les pics moins affectés, intermédiaires et très affectés de la manière suivante :

Moins affectés	=>	$R < m - 2 \sigma$
Intermédiaires	=>	$m - 2 \sigma < R < m + 2 \sigma$
Très affectés	=>	$R > m + 2 \sigma$

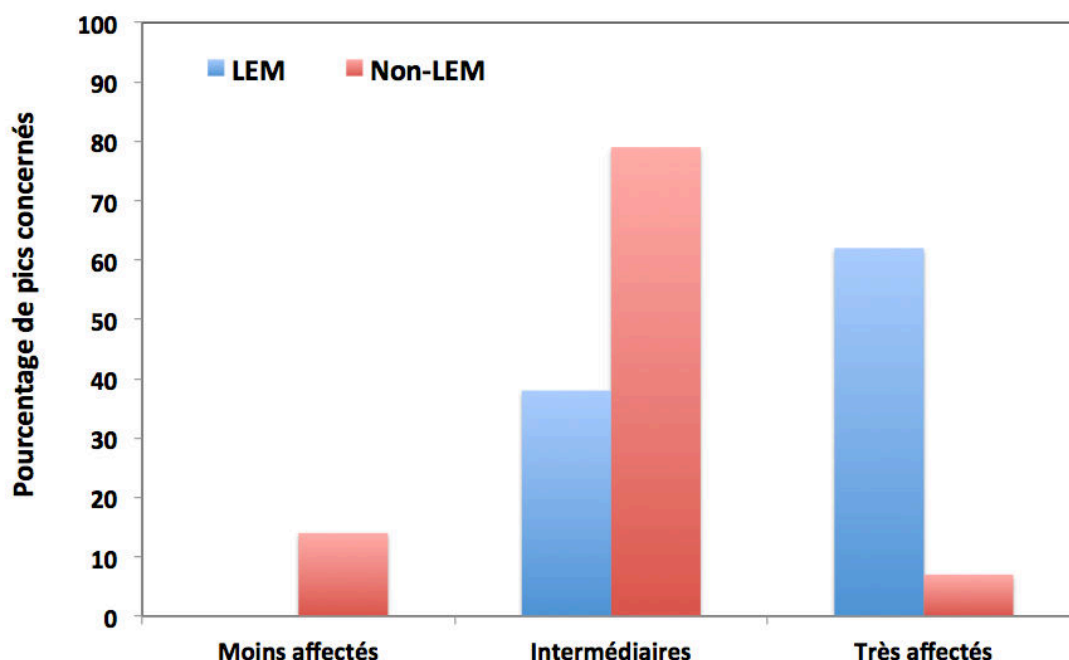


Figure 122 : Résidus de l'émerine impliqués dans l'interaction avec l'actine G

Les ratios d'intensité des résidus du domaine LEM (bleu) et de la partie désordonnée, non-LEM (rouge) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état Moins affectés, Intermédiaires ou Très affectés.

Il semble très clairement que les pics correspondants aux résidus du domaine LEM sont les plus affectés et donc ceux qui seraient impliqués dans l'interaction avec l'actine G (Figure 122). Les pics correspondants aux résidus de la partie désordonnée de l'émerine (Non-LEM) présentent, quant à eux, des ratios d'intensité intermédiaires et semblent donc moins impliqués dans l'interaction.

J'ai ensuite réalisé une titration de cette interaction par RMN en ajoutant différentes concentrations d'actine G sur un échantillon d'émerine à concentration constante. Pour chaque pic de l'HSQC correspondant à un résidu très affecté dans l'interaction, j'ai réalisé un graphique de son intensité sur le spectre RMN par rapport à la concentration d'actine G ajoutée à l'échantillon. Un exemple est représenté en Figure 123. De cette manière j'ai ainsi pu estimer la constante d'affinité de l'interaction pour chaque pic affecté. La moyenne des affinités obtenues est de 2.7 μM avec un écart type de 1.8 μM .

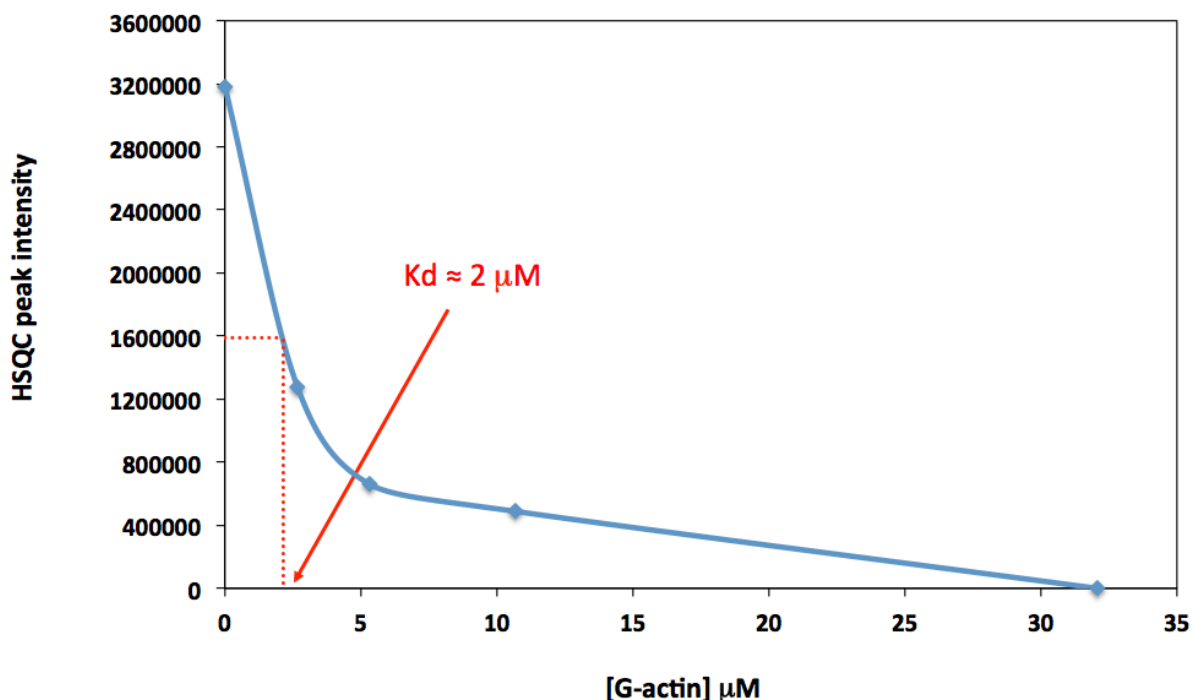


Figure 123 : Estimation de l'affinité de l'interaction émerine – actine G

La courbe représente l'intensité d'un des pics très affectés sur le spectre HSQC en fonction de la concentration d'actine G dans l'échantillon (0, 7.5, 15, 22.5 ou 30 μM). La valeur à mi-hauteur permet d'obtenir une estimation de l'affinité de l'interaction.

Dans nos conditions, l'émerine 1-187 interagit avec l'actine G (monomérique) avec une affinité d'environ 3 μM et il semblerait que ce soit la région structurée de l'émerine, le domaine LEM, qui soit impliquée dans cette interaction. Dans ces conditions de tampon peu réductrices (5 mM de Tris-HCl pH 7.8, 100 μM de CaCl_2 , 200 μM d'ATP et 1 mM de DTT) imposées par la sensibilité de l'actine, et à des concentrations si faibles (30 μM), l'émerine est probablement sous la forme d'un mélange de monomères et dimères. Mais il serait nécessaire de déterminer précisément les différentes formes oligomériques de l'émerine dans ces conditions par des expériences d'UCA.

Interaction émerine – actine F :

De la même manière, j'ai testé l'interaction entre l'émerine et l'actine F (Figure 124) toujours en utilisant l'émerine 1-187 recombinante et la même actine G purifiée au LEBS (CNRS, Gif-sur-Yvette). Pour obtenir de l'actine F, j'ai simplement concentré l'actine G sur Amicon, étape suffisante pour déclencher la polymérisation de l'actine.

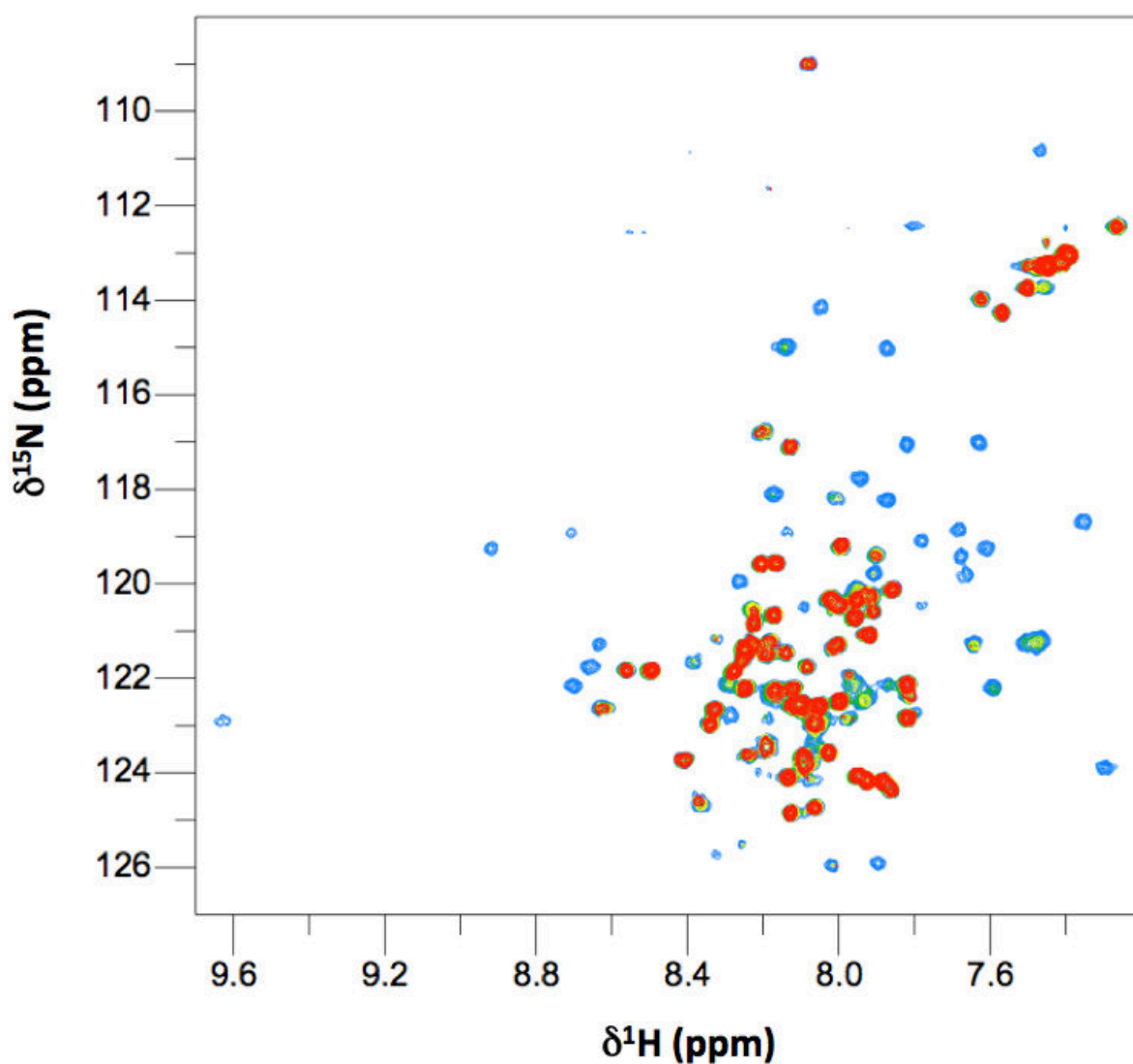


Figure 124 : Interaction émerine-actine F par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de l'émerine 1-187 marquée ^{15}N à 100 μM seule (bleu) ou en présence d'actine F (25 μM en vert, 50 μM en jaune, 75 μM en orange et 100 μM en rouge). Tampon : 5 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 μM CaCl_2 , 200 μM ATP et 1 mM DTT.

J'ai traité ces données de la même manière que pour l'interaction émerine – actine G. Pour cette expérience, $m = 16.8$ et $\sigma = 5.1$. Ce qui signifie que la présence d'actine F induit une diminution moyenne de l'intensité des pics de l'émerine de 83.2%.

En considérant les pics moins affectés, intermédiaires et très affectés de la manière suivante :

Moins affecté $\Rightarrow R < m - 2\sigma$

Intermédiaires $\Rightarrow m - 2\sigma < R < m + 2\sigma$

Très affecté $\Rightarrow R > m + 2\sigma$

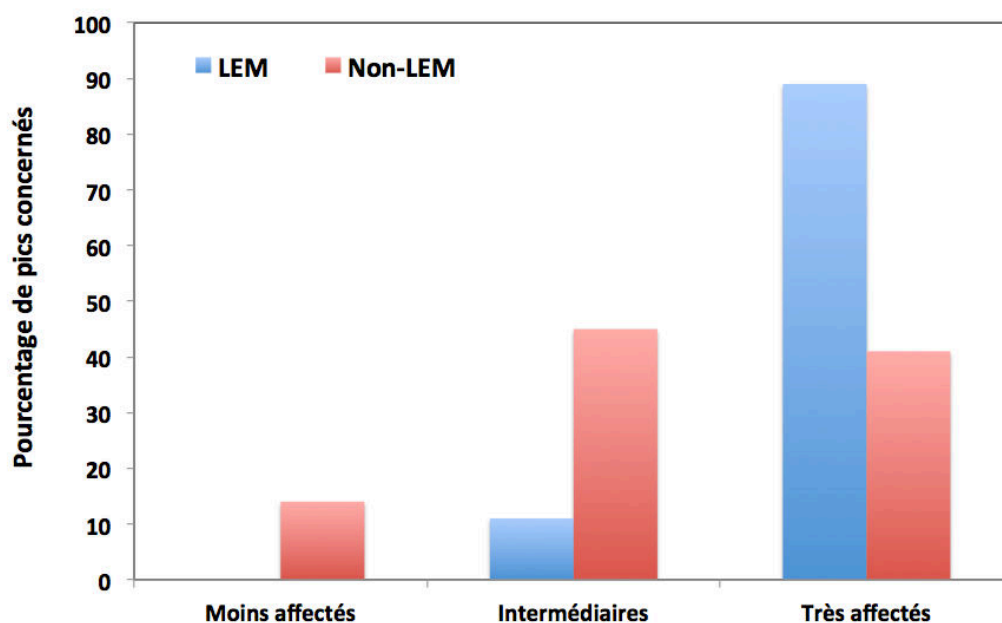


Figure 125 : Résidus de l'émerine impliqués dans l'interaction avec l'actine F

Les ratios d'intensité des pics correspondant aux résidus du domaine LEM (bleu) et de la partie désordonnée, non-LEM (rouge) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état Moins affecté, Intermédiaires ou Très affecté.

Comme pour l'interaction avec l'actine G, il semble que ce soit les pics correspondants aux résidus du domaine LEM qui sont les plus affectés et donc ceux qui seraient impliqués dans l'interaction avec l'actine F (Figure 125).

Après une titration et de la même manière que pour l'interaction émerine – actine G, pour chaque pic de l'HSQC correspondant à un résidu très affecté dans l'interaction, j'ai réalisé un graphique de son intensité sur le spectre RMN par rapport à la concentration d'actine F ajoutée à l'échantillon. Un exemple est représenté en Figure 126. De cette manière j'ai ainsi pu estimer la constante d'affinité de l'interaction pour chaque pic affecté. La moyenne des affinités obtenues est de 13.1 μM avec un écart type de 6.2 μM .

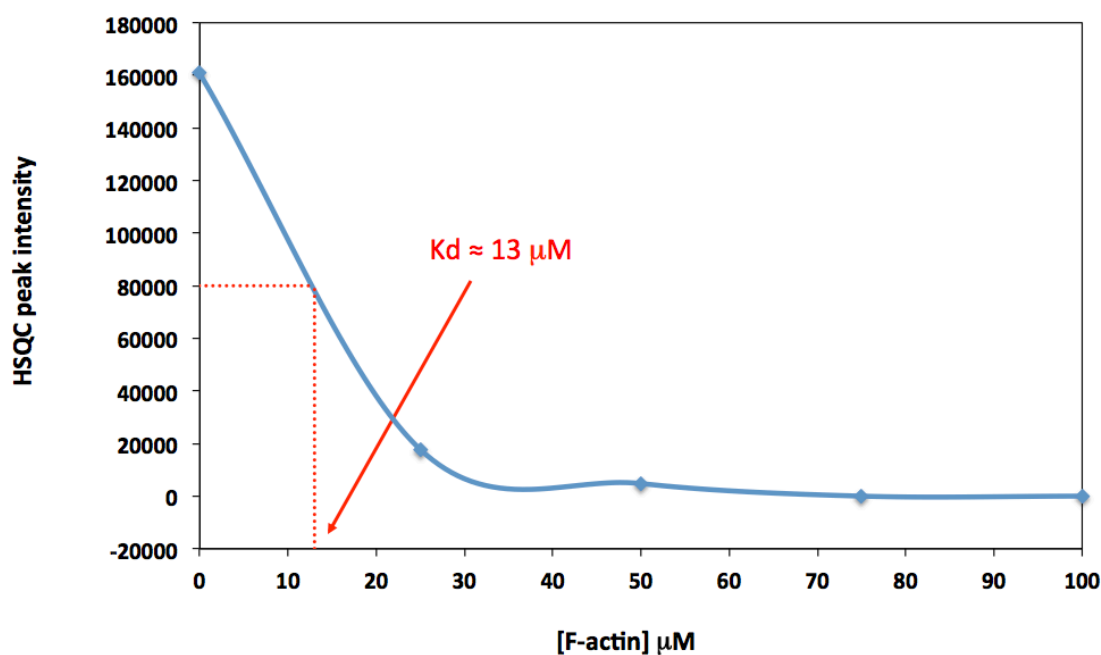


Figure 126 : Estimation de l'affinité de l'interaction émerine – actine F

La courbe représente l'intensité d'un des pics très affectés sur le spectre HSQC en fonction de la concentration d'actine F dans l'échantillon (0.25 ; 0.5 ; 0.75 ou 1 équivalent) avec 1 équivalent correspondant à 100 μM . La valeur à mi-hauteur permet d'obtenir une estimation de l'affinité de l'interaction.

L'affinité de l'interaction est d'environ 13 μM (Figure 126) mais il est très difficile de conclure sur cette expérience étant donné le manque d'information sur l'état oligomérique de l'actine mais également de l'émerine.

Si je compare maintenant le comportement des résidus du domaine LEM et de la partie désordonnée (Non-LEM) en présence d'actine G ou d'actine F, j'obtiens les graphiques représentés en Figure 127.

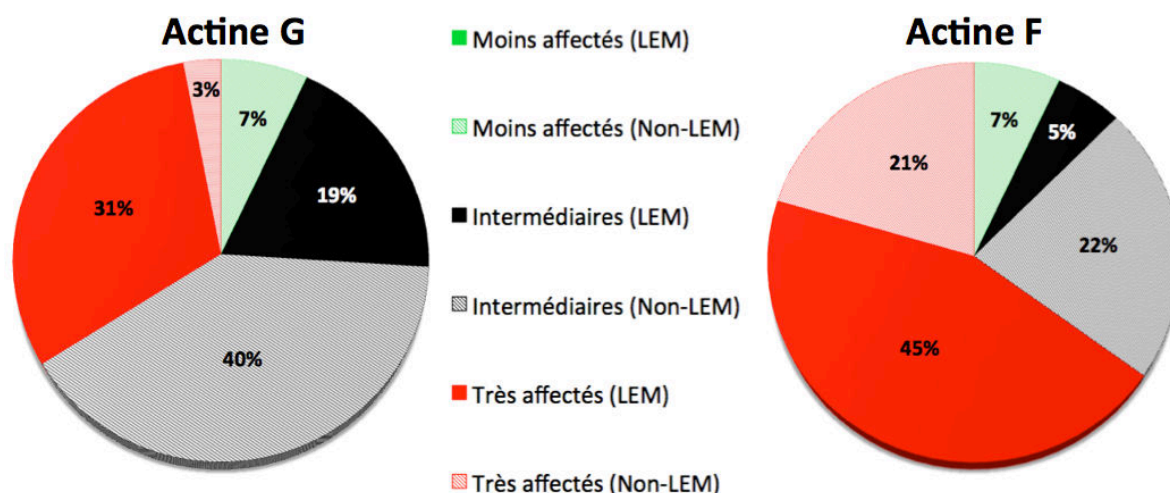


Figure 127 : Répartition des pics de l'émerine en fonction de leur comportement dans l'interaction avec l'actine

Pour l'interaction émerine – actine G :

- 34% des pics de l'émerine sont **très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 54%). 90% de ces pics très affectés sont des pics correspondant aux résidus du domaine LEM.
- 59% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 0 et 54%) et 68% de ces pics correspondent à des résidus de la partie déstructurée de l'émerine.
- 7% sont **moins affectés** (aucune diminution d'intensité) et tous correspondent à des résidus de la partie déstructurée de l'émerine.

Pour l'interaction émerine – actine F :

- 65% des pics de l'émerine sont **très affectés** par l'interaction (diminution de leur intensité de plus de 94%). 68% de ces pics très affectés correspondent aux résidus du domaine LEM.
- 28% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 73% et 94%). La plupart de ces pics (80%) correspondent à des résidus de la partie déstructurée de l'émerine.
- 7% sont **moins affectés** (diminution d'intensité inférieure à 73%) et tous correspondent à des résidus de la partie déstructurée de l'émerine.

Bilan des interactions émerine - actine

J'observe une interaction entre l'émerine et l'actine (G ou F), il semble que ce soit bien les pics correspondants aux résidus du domaine LEM qui soient en interaction avec l'actine et l'estimation des constantes d'affinité par RMN est du même ordre de grandeur dans les deux interactions (quelques μM). Dans l'interaction entre l'émerine et l'actine F, il faut noter que l'échantillon d'actine est un mélange actine G / actine F. Il est donc possible que l'interaction que j'ai observée dans cette expérience (impliquant les résidus du domaine LEM et ayant une affinité de 13 μM) ne soit en fait que la visualisation de l'interaction entre l'émerine et les restes d'actine G présents dans l'échantillon.

La différence majeure pour ces deux expériences d'interaction émerine – actine est que dans l'interaction entre l'émerine et l'actine F, la diminution d'intensité moyenne est de 83.2% alors qu'elle n'est que de 8.6% avec l'actine G. Deux causes peuvent être à l'origine de cette diminution d'intensité conséquente en présence de filaments d'actine :

- soit l'émerine interagit avec l'actine F formant un complexe possédant un poids moléculaire beaucoup plus élevé que le complexe avec l'actine G, aboutissant à des largeurs de raies de l'état lié plus importantes.
- soit l'actine F entraîne une précipitation de l'émerine non spécifique (diminution des intensités due à l'émerine précipitée au fond du tube).

IV.2. LES INTERACTIONS IMPLIQUANT SUN1

J'ai tout d'abord essayé de produire et purifier plusieurs constructions de SUN1 :

- Le domaine nucléoplasmique entier de SUN1 (1-355, contenant la partie distale 223-302 interagissant avec l'émerine⁵⁰) seul : SUN1 (1-355) ou avec un peptide de fusion forçant la trimérisation SUN1 (1-355) – GCN4. La trimérisation du domaine périnucléaire de SUN1 a été montrée nécessaire à son interaction avec les nesprines¹⁰. On peut donc imaginer que son domaine nucléaire est également sous forme trimérique dans la cellule.
- La région 1-208 interagissant avec l'émerine avec une faible affinité⁵⁰.
- La région 1-139 interagissant avec la lamine A⁵⁰.
- La région 1-114, WT ou mutée C14S. Ces deux dernières régions ont été construites plus tardivement, pour l'analyse structurale de l'oligomérisation de SUN1 car elles ne possèdent plus que 1 ou 0 cystéines.

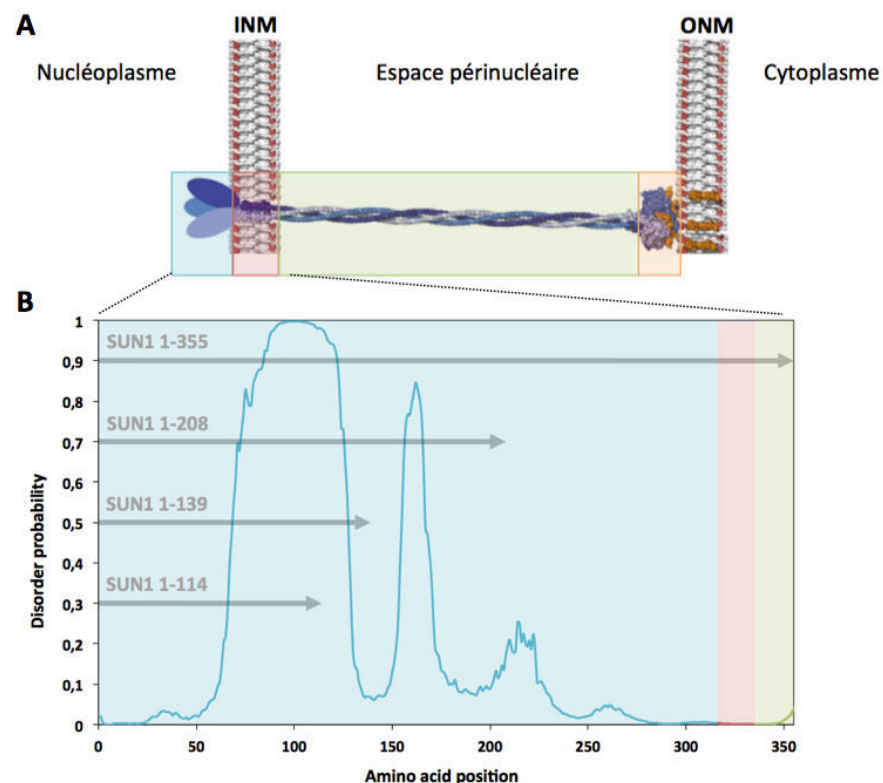


Figure 128 : Organisation structurale de SUN1

A. Modèle du complexe LINC entre le trimère de SUN2 (nuances de bleu) et 3 peptides KASH des nesprines (orange). Les rectangles colorés représentent ; le domaine nucléoplasmique (cyan), le domaine transmembranaire (rouge), le domaine périnucléaire en super hélice (vert) et le domaine SUN (orange). Adapté de¹⁰ B. Diagramme de prédiction de désordre de SUN1 par Disopred2.0²⁰⁰. Les couleurs correspondent aux mêmes régions représentées en A. Les constructions étudiées sont représentées par des flèches grises.

Les tests d'expression (Figure 129) montrent des protéines produites avec des niveaux d'expression très corrects à l'exception de 1-355. Il est possible que cette construction, nécessite des conditions de cultures particulières. Pour toutes les autres constructions, les protéines correspondantes sont insolubles et donc produites en corps d'inclusion. J'ai donc opté pour un protocole de purification, similaire à celui de l'émerine 1-187, avec une chromatographie d'affinité dans 8 M urée et une renaturation par filtration sur gel ou par bains de dialyses successifs. J'ai eu énormément de difficultés à purifier ces constructions car elles précipitent/s'agrègent très facilement, en particulier lors des étapes de concentration lorsque la concentration en protéine dépasse 20 μ M.

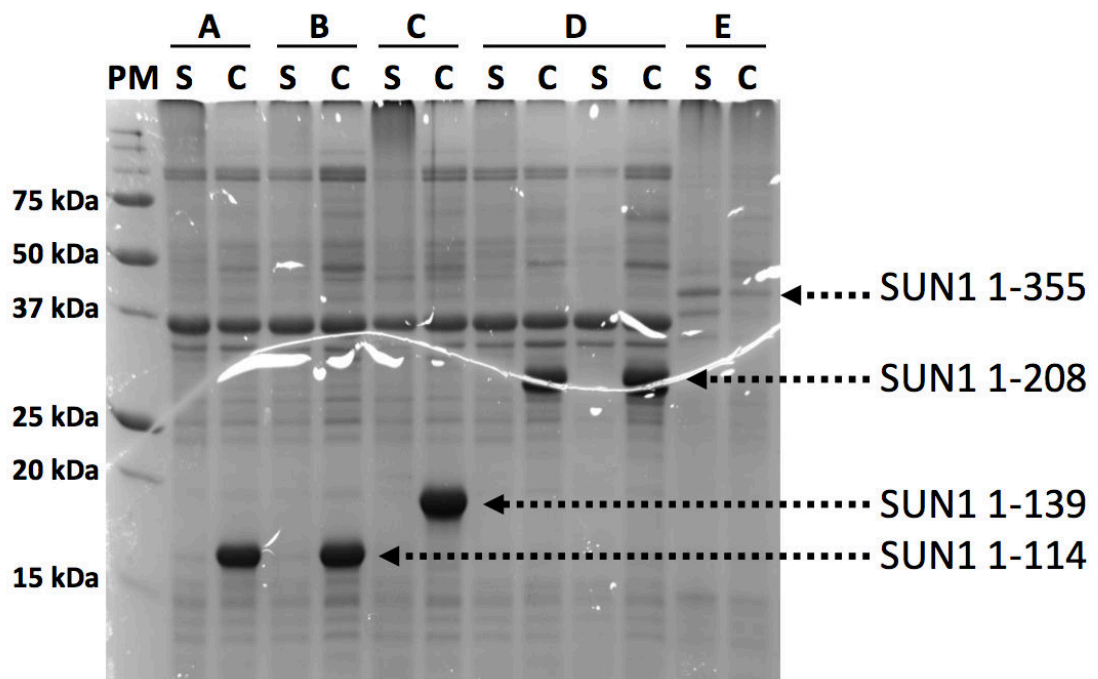


Figure 129 : Tests d'expression des différentes constructions de SUN1

Les différentes constructions de SUN1 (A = 1-114 C14S ; B = 1-114 ; C = 1-139 ; D = 1-208 et E = 1-355) ont été produites avec différentes conditions de cultures (tests d'expression). Le gel SDS-PAGE présenté ici, montre les résultats de la lyse dans l'urée (S = surnageant et C = culot) obtenus pour la meilleure condition d'expression (Culture à 37°C jusqu'à une D.O. de 1, puis induction à 20°C O/N par ajout de 0.5 mM IPTG). Toutes les constructions s'expriment très bien dans *E. coli*, mais sont retrouvées dans les corps d'inclusions (C = culot). Seule la construction 1-355 n'a pas pu être obtenue, quelles que soient les conditions de culture.

J'ai cependant pu obtenir un échantillon de SUN1 1-139 à une concentration correcte pour une étude RMN. Cette région 1-139 de SUN1 a été montrée comme interagissant fortement avec la lamine A ⁵⁰, et plus précisément avec le domaine C-terminal des lamine A, absent dans les lamine C ²¹⁷ et des mutations dans le domaine queue de la lamine A semblent perturber cette interaction ⁵⁰. J'ai donc désiré tester cette interaction par RMN, entre la région de SUN1 (1-139) et la queue C-terminale de la lamine A (389-646).

Sur la base de nombreux essais, j'ai montré que la construction 1-139 de SUN1 qui a un pI de 8.65 précipite lors des concentrations dans un tampon 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP et 10 mM MgCl₂ lorsque sa concentration dépasse quelques dizaines de μ M.

J'ai donc tenté une nouvelle approche qui est de concentrer SUN1 en présence de son partenaire potentiel, la lamine A. De cette façon, la lamine A pourrait empêcher l'agrégation de SUN1. Le problème étant qu'il m'est impossible de déterminer précisément la concentration finale de chacune des protéines. Pour obtenir 2 échantillons comparables, un contenant uniquement de la lamine A 389-646 et l'autre contenant la lamine A 389-646 et SUN1 1-139, j'ai mélangé :

- tube 1 : 1 mL de lamine A 389-646 ¹⁵N à 7.94 μ M + 720 μ L de tampon
- tube 2 : 1 mL de lamine A 389-646 ¹⁵N à 7.94 μ M + 720 μ L de SUN1 1-139 à 40 μ M

Les deux échantillons ont ensuite été concentrés jusqu'à 180 μ L et observés par RMN ([Figure 130](#)).

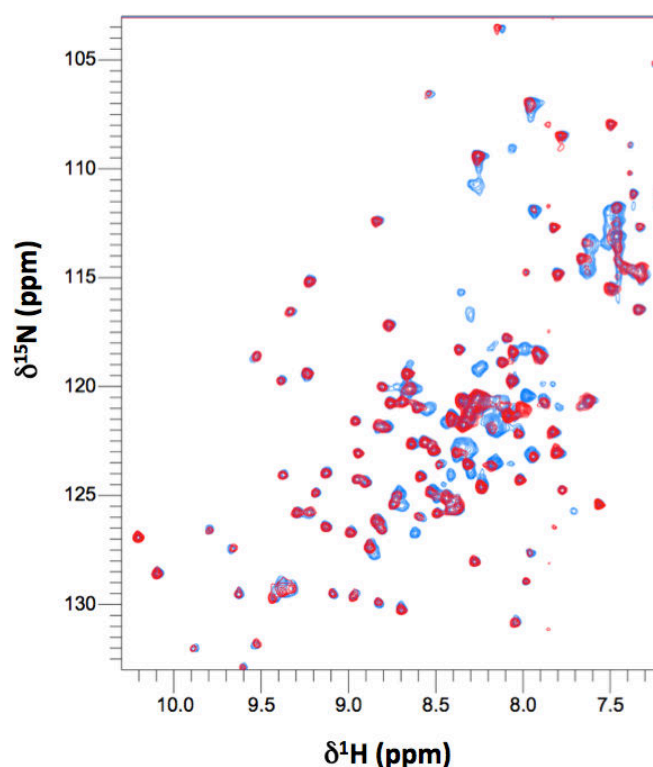


Figure 130 : Interaction entre la lamine A 389-646 et SUN1 (1-139) par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine A 389-646 à 79.4 μM marquée ^{15}N seule (bleu) ou en présence de 400 μM de SUN1 1-139 (rouge). Tampon : 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP et 10 mM MgCl_2 . Concentrations estimées dans le cas où il n'y aurait aucune perte à la concentration.

Une interaction est visible entre la région 1-139 de SUN1 et la lamine A 389-646. Ayant l'attribution du domaine IgFold de la lamine A (des résidus 428 à 549, PDB : 1IVT), j'ai attribué sur mon spectre de la lamine A 389-646 les pics de l'IgFold 428-549. J'ai considéré les autres pics comme faisant partie des régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold (389-427 et 550-646). J'ai quantifié la perte d'intensité de chaque pic de la lamine A 389-646 après contact avec SUN1 en calculant le ratio intensité finale / intensité initiale. Pour un pic A, son ratio d'intensité est :

$$R_A = \frac{\text{Intensité sur le spectre lamine A - SUN1}}{\text{Intensité sur le spectre lamine A seule}}$$

J'ai ainsi calculé les R de chaque pic de l'HSQC. J'ai ensuite calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) de ces R. Pour cette expérience, $m = 64.4$ et $\sigma = 34.4$. Soit une diminution moyenne de l'intensité des pics de la lamine A 389-646 de 35.6 % en présence de SUN1 1-139. Je définis les pics moins affectés, intermédiaires et très affectés de la manière suivante :

Moins affectés	=>	$R < m - \sigma$
Intermédiaires	=>	$m - \sigma < R < m + \sigma$
Très affectés	=>	$R > m + \sigma$

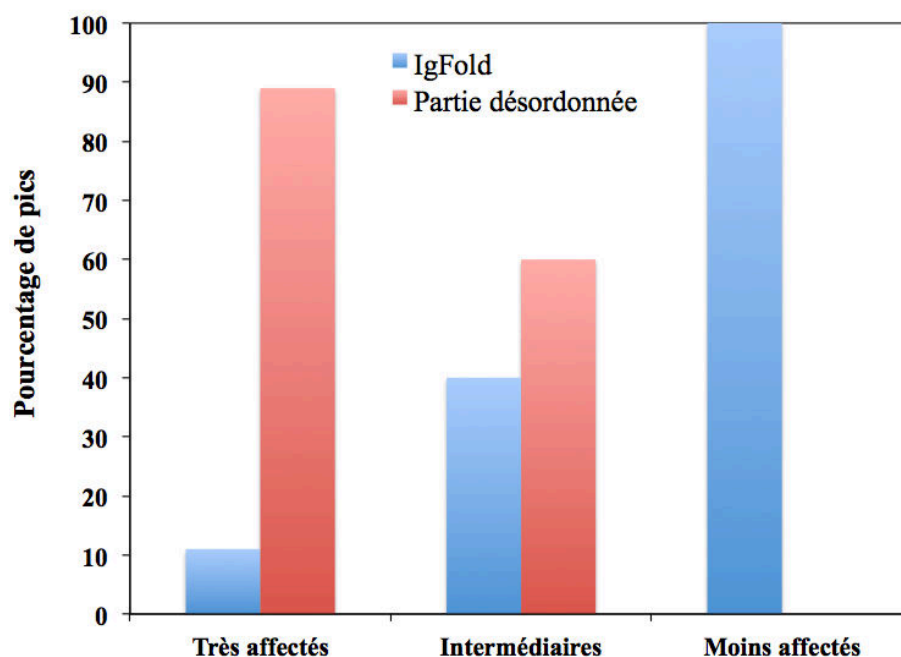


Figure 131 : Résidus de la lamine A 389-646 impliqués dans l'interaction avec SUN1

Les ratios d'intensité des pics correspondant aux résidus du domaine LEM (bleu) et de la partie désordonnée, non-LEM (rouge) ont été calculés, comparés aux valeurs moyennes (moyenne et écart type) et catégorisés en fonction de leur état Moins affectés, Intermédiaires ou Très affectés.

Les conclusions pour cette expérience sont :

- 34% des pics de la lamine A 389-646 sont **très affectés** par l'interaction (diminution d'intensité supérieure à 70%). 89% de ces pics très affectés correspondent à des résidus des régions désordonnées de la queue C-terminale de la lamine A.
- 33% des pics subissent une diminution d'intensité **moyenne** (entre 2% et 70%). 40% de ces pics correspondent à des résidus du domaine IgFold de la lamine A.
- 33% sont **moins affectés** (diminution d'intensité inférieure à 2%) et tous correspondent à des résidus du domaine IgFold de la lamine A.

Il semble très clairement que les pics correspondant aux résidus des parties désordonnées de la lamine A 389-646 sont les plus affectés et donc ceux qui seraient impliqués dans l'interaction avec SUN1 (Figure 131). Les pics de l'IgFold (428-549) sont majoritairement peu affectés ou stables. Mais certains pics de l'IgFold sont cependant affectés par la présence de SUN1.

J'ai donc cartographié les résidus de la lamine A 389-646 les plus affectés par la présence de SUN1 (diminution de leur intensité de plus de 70%) sur la structure connue de l'IgFold 428-549 (Figure 132).

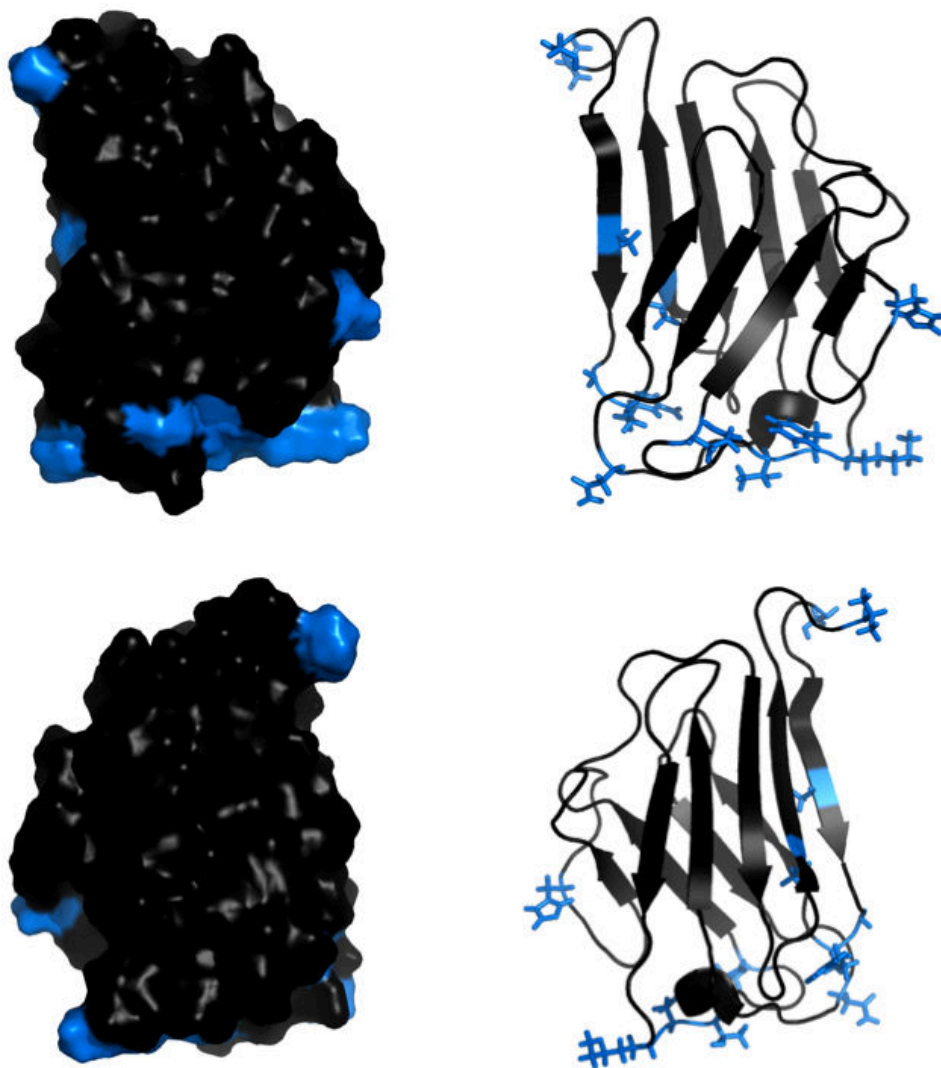


Figure 132 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec SUN1

Vue de la structure PDB du domaine IgFold 428-549 de la lamine A en représentation surface et cartoon, chacune également représentée après une rotation de 180°. Les résidus de l'IgFold 429-548 (PDB : 1IVT) sont représentés en noir. Les résidus très affectés par la présence de SUN1 (résidus dont les variations d'intensité des pics sur l'HSQC sont les plus importantes entre les HSQCs de la protéine seule et du complexe) sont représentés en bleu.

Les résidus de l'IgFold de la lamine A les plus affectés par la présence de SUN1 1-139 sont S428, A434, G438, R439, N459, K486, F487, T488, Q493, H506, A539 et V549.

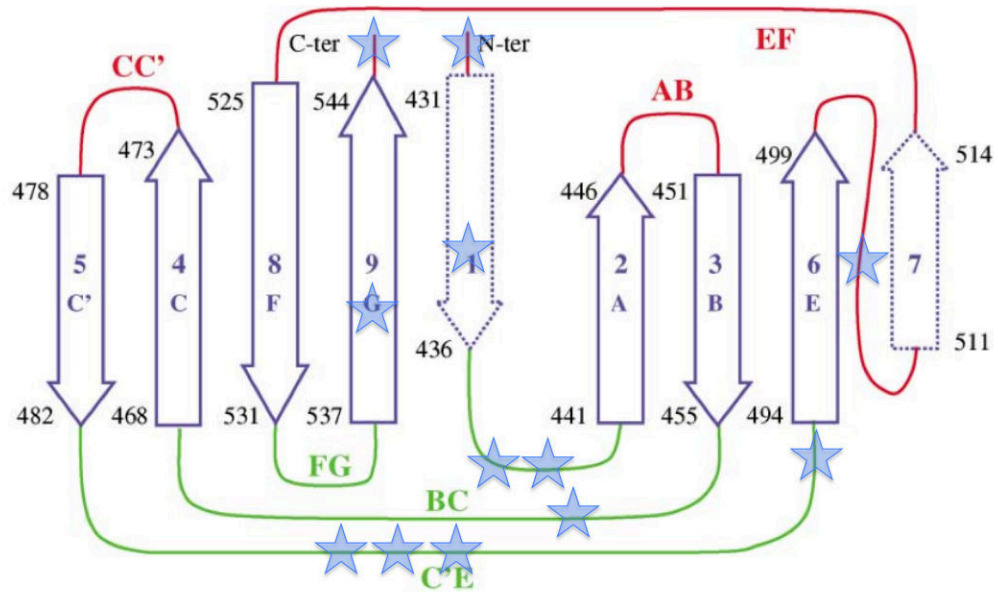


Figure 133 : Topologie du domaine C-terminal de la lamine A en interaction avec SUN1. Adapté de ³⁰

Les brins β appartenant aux deux feuillets β sont représentés par des flèches violettes. Leurs limites sont indiquées par les positions des résidus aux deux extrémités de chaque flèche. Les feuillets représentés par des flèches en pointillés sont spécifiques de l'IgFold de la lamine A, alors que les autres sont retrouvés dans toutes les structures de type immunoglobuline. Les boucles situées du côté des extrémités N et C-terminales sont représentées en rouge et les boucles situées à l'opposé sont représentées en vert. Les résidus observés comme étant affectés par la présence de SUN1 sont représentés par des étoiles bleues.

Des mutations sur ces résidus ont été retrouvées chez des patients souffrant de différentes laminopathies et plus particulièrement de Lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan avec hypertrophie des muscles squelettiques. Parmi ces mutations on retrouve R439C ²¹⁸, K486N ²¹⁹ et H506D ²²⁰. Pour deux de ces mutations (R439C et H506D), les noyaux de cellules de patients ont été observés et présentent des anomalies comme la présence de protrusions. Alors que l'expression et la localisation de la lamine A et de l'émerine ne sont pas affectées, les lamines de type B sont peu ou pas présentes au niveau de ces protrusions. Des analyses plus poussées ont montré que dans le cas du mutant R439C, l'introduction d'un résidu cystéine à la surface de l'IgFold favorisait l'oligomérisation de la protéine et diminuait son interaction avec l'ADN.

IV.3. LES INTERACTIONS IMPLIQUANT BAF

L'accumulation de prélamine A WT (dans le cas de Dermopathie restrictive) et de prélamine A mutante (dans le cas de Lipodystrophie partielle familiale et dysplasie mandibulo-acrale) affectent la localisation de BAF ²²¹, une protéine interagissant avec la lamine A. De plus, la mutation A12T sur BAF, conduit à une envelopathie à phénotype progéroïde ²²². Toutes ces maladies présentant des défauts dans la réponse au stress mécanique. Par ailleurs il a été montré que la phosphorylation de BAF sur sa sérine 4 régule l'interaction entre l'émerine et la lamine A ²²³, 2 protéines majeures de la réponse au stress mécanique.

Mon objectif était donc de tester l'interaction de BAF avec la lamine A mais également avec l'émerine, interaction déjà décrite dans la littérature (comme contrôle positif). BAF interagit sous forme de dimère avec le domaine LEM de l'émerine et un modèle de la structure tridimensionnelle de ce complexe a été proposé en 2007 ⁷⁹ (Figure 134).

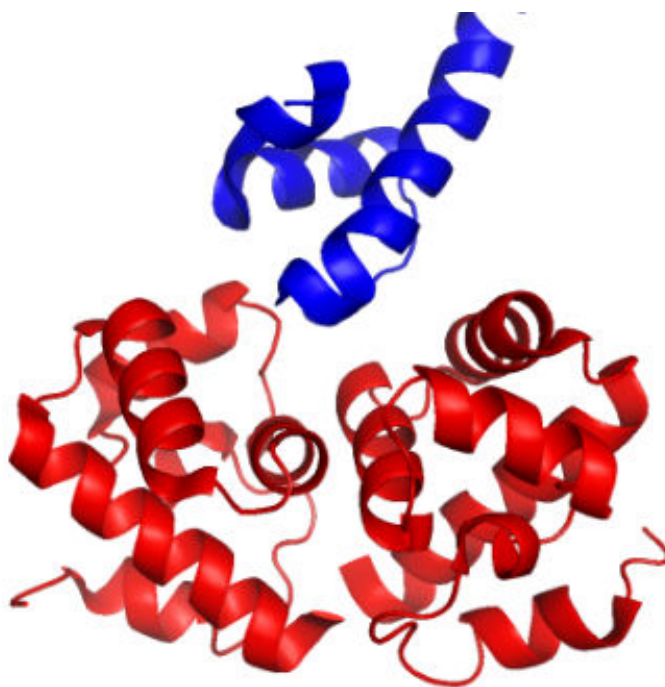


Figure 134 : Modèle de la structure du complexe BAF₂-émerine ⁷⁹

Modèle du domaine LEM de l'émerine (bleu) en interaction avec le dimère de BAF (rouge). La stoechiométrie a été calculée par SEC-MALS, UCA et RMN, et les distances intermoléculaires ont été déterminées par RMN.

J'ai donc d'abord produit et purifié la protéine BAF. La production est efficace mais la protéine est produite dans les corps d'inclusions, nécessitant une purification dans l'urée. La première étape de purification est une chromatographie d'affinité, réalisée grâce à la présence d'une étiquette de 8 histidines en N-terminal de la protéine (Figure 135).

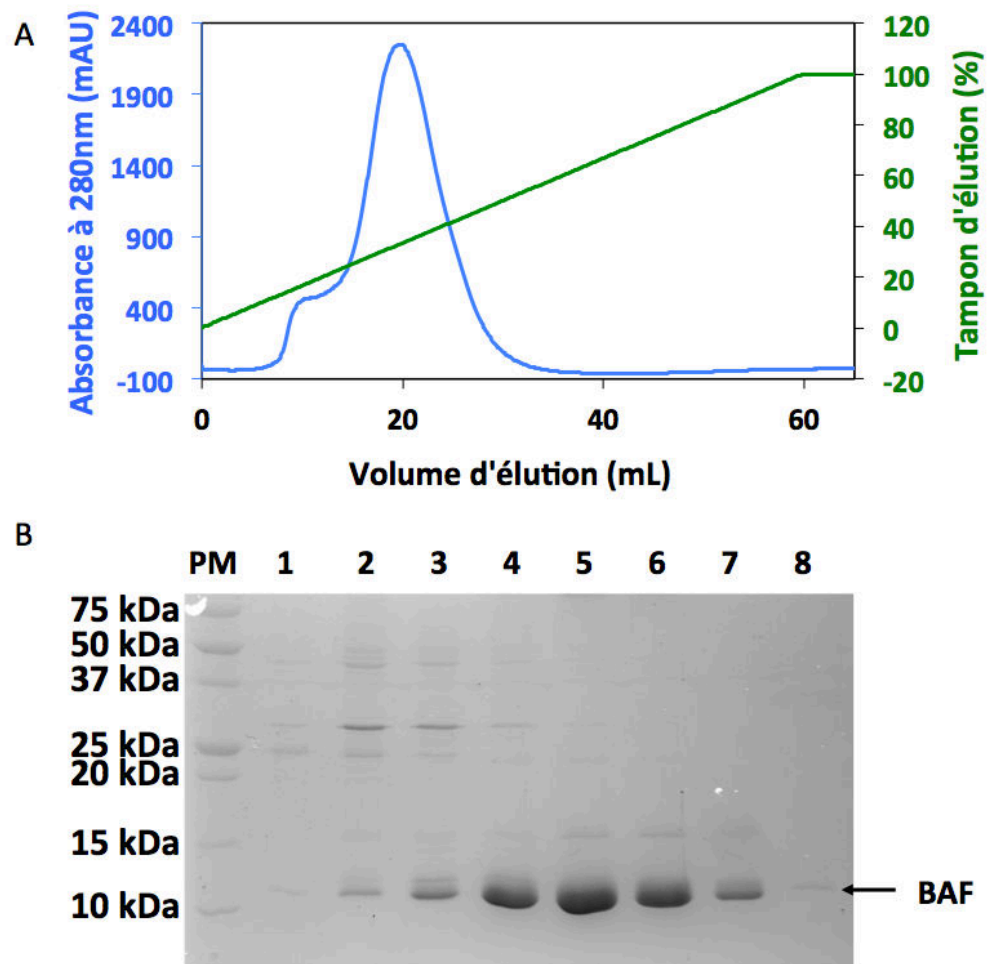


Figure 135 : Purification de BAF

A. Chromatogramme correspondant à la colonne d'affinité Ni-NTA. B. Gel SDS-PAGE correspondant. BAF est correctement surexprimé et pur après une étape de purification.

J'ai ensuite renaturé la protéine par dialyses successives. Comme je sais que BAF est capable de s'auto-associer, au moins sous forme de dimères, j'ai testé plusieurs conditions de dialyses, notamment en faisant varier la concentration en NaCl. Un même échantillon de BAF a été divisé et dialysé dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM β -mercaptoéthanol et 50 ou 500 mM NaCl. Les deux échantillons obtenus ont été ensuite concentrés et injectés sur une colonne de filtration sur gel équilibrée dans le tampon correspondant (Figure 136).

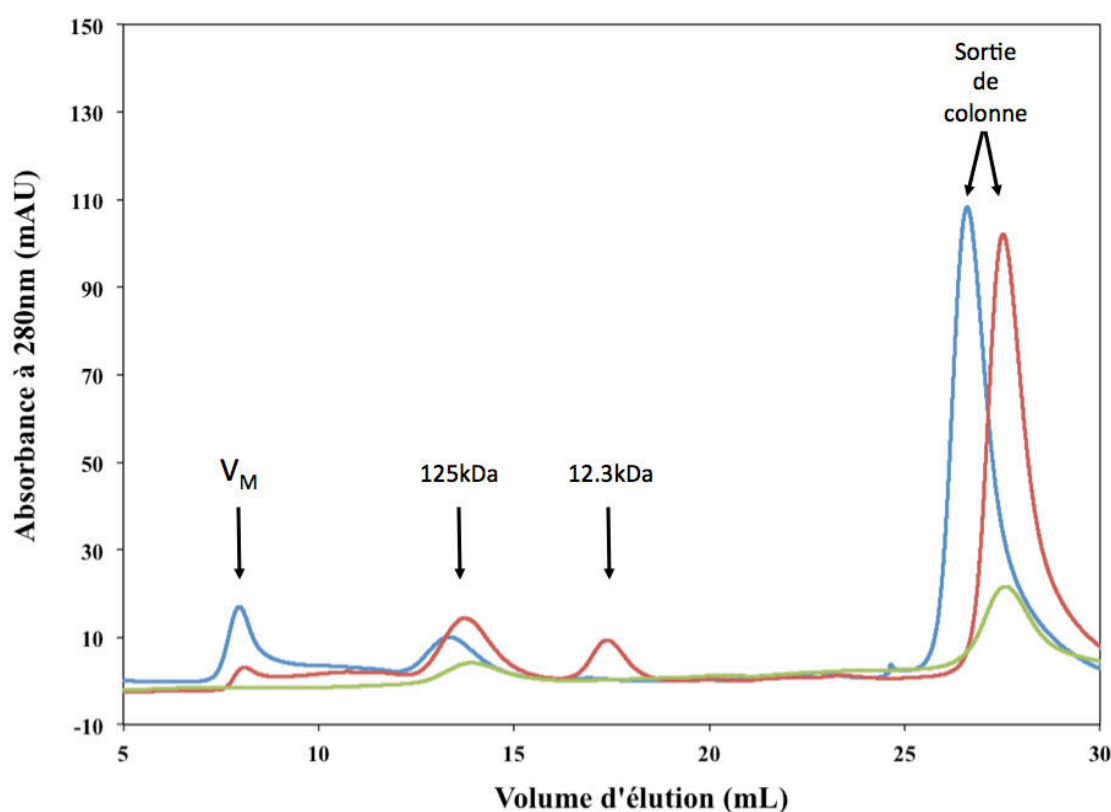


Figure 136 : Tests de filtration sur gel de BAF dans différentes concentrations en NaCl

Chromatogrammes des filtrations sur gels obtenus sur des échantillons de BAF dans 50 mM NaCl (bleu) et 500 mM NaCl (rouge). Le pic à 125 kDa de l'échantillon à 500 mM a été réinjecté directement sur la colonne pour voir si ce complexe était capable de se dissocier (vert).

Quelle que soit la concentration en sel, BAF est capable de former de très gros objets (sortant dans le volume mort V_M de la colonne), mais également de gros oligomères de 125 kDa (10mères ?). La différence notable est que des monomères (12.3 kDa) ne sont présents que dans la condition à 500 mM NaCl. Par curiosité, j'ai injecté de nouveau les fractions correspondantes au pic du gros oligomère de 125 kDa dans 500 mM NaCl (courbe rouge) sur la même colonne équilibrée dans 500 mM NaCl. Ces gros oligomères sont très stables et ne peuvent pas se dissocier (courbe verte), suggérant que cette association et sa stabilisation sont dues à l'oxydation de l'échantillon.

IV.3.1. L'interaction BAF – émerine

J'ai essayé de reproduire l'interaction BAF – émerine par RMN avec mes protéines recombinantes, de sorte à vérifier le bon repliement de BAF et de l'émerine après purification dans l'urée. J'ai étudié l'interaction dans les deux sens, en marquant BAF ^{15}N et en ajoutant l'émerine non marquée (Figure 137A) ou en marquant l'émerine ^{15}N et en ajoutant BAF non marquée (Figure 137B). J'observe une diminution des signaux dans les deux cas, caractéristique de la présence d'une interaction. En étant capable de reproduire cette interaction, je peux estimer que mes protéines sont bien repliées après les bains de dialyse successifs.

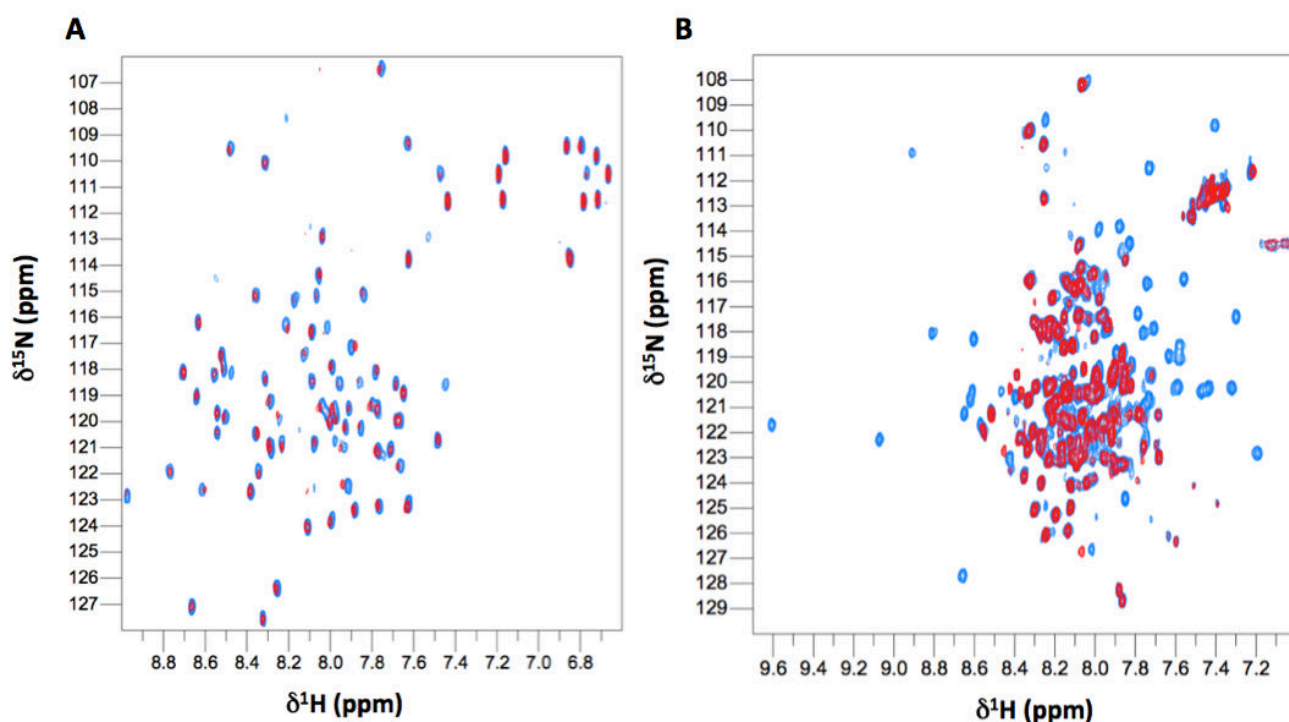


Figure 137 : Interaction BAF - émerine par RMN

A. Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de BAF à 12.5 μM marquée ^{15}N seule (bleu) ou en présence d'1 équivalent d'émerine 1-187 (rouge). Tampon : 40 mM phosphate pH 6.7, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP et 1 mM EDTA. **B.** Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de l'émerine 1-187 à 100 μM marquée ^{15}N seule (bleu) ou en présence de 20 μM de BAF (rouge). Tampon : 40 mM phosphate pH 6.7, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP et 1 mM EDTA.

IV.3.2. L'interaction BAF – lamine A

De la même manière, j'ai voulu tester l'interaction entre BAF et la lamine A par RMN (Figure 138 et Figure 139).

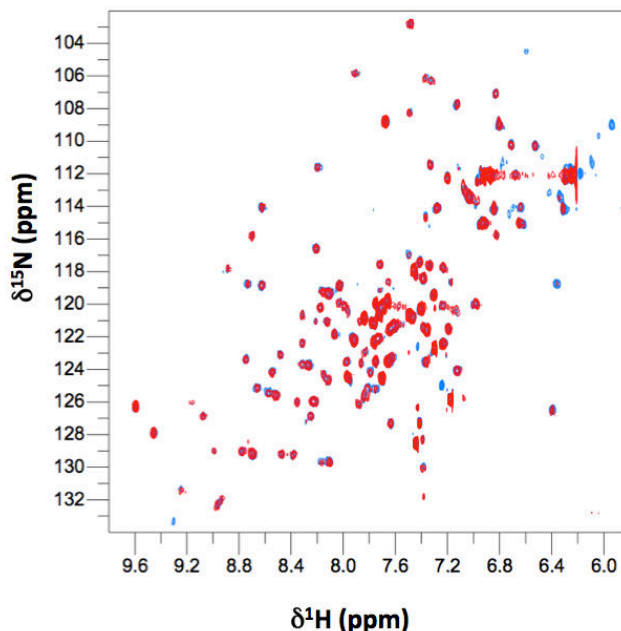


Figure 138 : Interaction lamine A 389-646 ^{15}N - BAF par RMN

Superposition des ^1H - ^{15}N HSQCs de la lamine 389-646 à 100 μM marquée ^{15}N seule (bleu) ou en présence de 11 μM de BAF (rouge). Tampon : 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl et 1 mM TCEP.

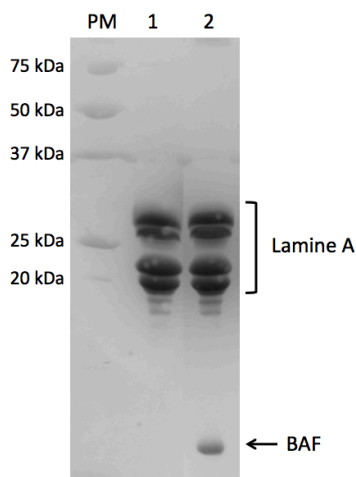


Figure 139 : Gel SDS-PAGE de l'interaction par RMN entre la lamine A 389-646 ^{15}N et BAF

Le puits 1 correspond à l'échantillon de lamine A 389-646 ^{15}N seule et le puits 6 correspond à l'échantillon de lamine A 389-646 en présence de BAF

Je n'observe pas d'interaction directe entre ces deux protéines. L'échantillon de BAF était trop peu concentré il est donc difficile de conclure.

CONCLUSION

Les protéines de l'EN jouent un rôle essentiel dans différents processus cellulaires comme (1) l'organisation du génome et la régulation de l'expression des gènes, (2) la régulation des voies de signalisation et la réponse aux dommages de l'ADN et (3) la position, forme et taille du noyau. Certaines protéines de cette enveloppe nucléaire comme l'émerine, les lamines de type A, SUN1, BAF et l'actine nucléaire participent activement aux propriétés mécaniques du noyau et de la cellule influençant ainsi de nombreux autres processus cellulaires.

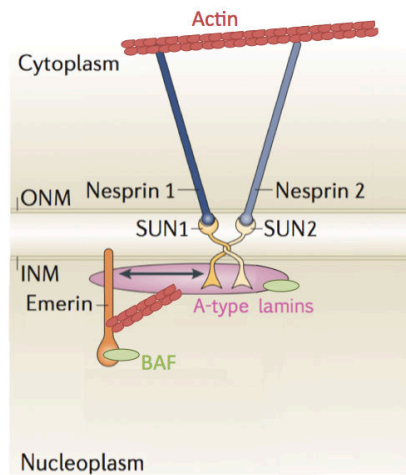


Figure 140 : Interactions protéine-protéine à l'INM, importantes pour les propriétés mécaniques du noyau

Ces protéines subissent des changements, en général réversibles, afin de répondre à un stress mécanique :

- Des changements de structures tertiaire (déstabilisation du domaine IgFold des lamines de type A après un stress mécanique ¹⁵⁴) et d'état oligomérique (trimérisation des protéines SUN pour s'associer aux nesprines et résister à l'application d'une force ¹⁰). Ces changements régulent parfois leur interaction avec leurs partenaires ^{10, 79}.
- Des modifications post-traductionnelles, régulant à la fois leur état structural et oligomérique mais également leur interaction avec leurs partenaires et de ce fait ayant un impact sur la réponse à un stress mécanique ¹⁵².

Peu d'événements moléculaires ont été décrits à ce jour permettant d'expliquer les mécanismes d'action de ces protéines, mais on sait que l'intégrité de l'enveloppe nucléaire est indispensable aux propriétés mécaniques de la cellule. Il me paraît donc essentiel de décrire quels sont les événements moléculaires (changement de structure tertiaire, d'état oligomérique et de modifications post-traductionnelles) permettant l'assemblage et le bon fonctionnement de l'EN et de comprendre comment cette enveloppe répond à un stress mécanique et en particulier comment ce type de stress modifie les propriétés de liaison de l'enveloppe nucléaire.

L'émerine 1-187 forme des filaments *in vitro*

La majeure partie de mon travail de thèse a été la caractérisation structurale de l'émerine en utilisant la construction 1-187 correspondant à la partie nucléoplasmique prédite comme majoritairement désordonnée. Effectivement, j'ai pu déduire par des expériences de RMN, filtration sur gel et SDS-PAGE que les monomères d'émerine étaient structuralement désordonnés/flexibles.

Mais le monomère n'est pas le seul état oligomérique que l'émerine peut adopter. Il a déjà été proposé que l'émerine puisse s'auto-associer *in vitro*^{195, 213}. J'ai pu montrer que l'émerine 1-187 pouvait former des monomères, des dimères (que j'ai associé à des artéfacts de manipulation) et des oligomères de plus haut poids moléculaires *in vitro*. Parmi ces oligomères de haut poids moléculaire, j'ai pu observer par microscopie électronique à transmission des particules sphériques et des filaments curvilinéaires d'émerine 1-187 d'environ 10 nm de diamètre. Les monomères d'émerine s'associent pour former ces oligomères engendrant la formation de structures secondaires en feuillets β antiparallèles. La cinétique de formation des oligomères dépend naturellement de la concentration en protéine de l'échantillon et du temps d'incubation mais également de la température d'incubation. Nous essayons à l'heure actuelle, et par différentes techniques comme la spectrométrie de masse et la RMN du solide, de déterminer quels sont les résidus de l'émerine nécessaires et suffisants pour la formation de filaments.

Des proximités émerine-émerine en cellules ont été observées par PLA et immunofluorescence, résultats en accord avec les résultats obtenus *in vitro* suggérant une capacité de l'émerine à interagir avec elle-même, c'est à dire à s'auto-associer.

Les mêmes expériences (*in vitro* et en cellules) ont été réalisées sur 5 mutants causant la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (S54F, Q133H, P183H, P183T et Del95-99). Alors que la majorité de ces mutants forment des filaments, le mutant Del95-99 a un comportement très particulier. En effet, il est le seul qui dans toutes les conditions testées ne forme pas de filament.

Les 5 acides aminés absents dans ce mutant sont localisés dans une région prédite par Disopred2.0 comme partiellement repliée et prédite par Psipred comme étant l'unique région adoptant un repliement de type β , structure secondaire retrouvée dans les filaments d'émerine. Il semble donc que la délétion de ces résidus dans le mutant Del95-99 empêche la formation de feuillet β et ainsi l'auto-association de l'émerine en filaments.

Étant le seul mutant à avoir été montré incapable de lier la lamine, j'ai émis l'hypothèse que l'assemblage de l'émerine en oligomères voire en filaments pourrait être nécessaire à son interaction avec la lamine A.

Enfin, ce mutant Del95-99 ne contient plus la tyrosine 95, connue pour être phosphorylée par Src après un stress mécanique. Cette phosphorylation permet au noyau de répondre à l'application d'une force. On peut donc imaginer une régulation de l'assemblage en filaments de l'émerine par les phosphorylations dans un contexte de stress mécanique (pour moduler la résistance et la déformation du noyau) mais aussi dans un contexte de cycle cellulaire (assemblage et désassemblage de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose).

Étude des phosphorylations de l'émerine par RMN

Une autre partie de ma thèse était d'identifier et de mesurer les cinétiques d'apparition des phosphorylations de l'émerine et de comprendre les dépendances entre ces différentes modifications. Le but étant de déterminer l'impact de ces modifications sur l'état oligomérique de l'émerine et sur ses interactions avec ses partenaires. Ce projet parallèle n'est qu'à une étape préliminaire, mais j'ai déjà pu observer des phosphorylations de l'émerine *in vitro* par RMN, notamment par la kinase Src (montrée comme phosphorylant l'émerine après un stress mécanique), par la kinase ck1 et par les kinases ck2 et gsk3 β . L'attribution des signaux RMN de l'émerine est en cours et me permettra de déterminer quels sont les résidus de l'émerine phosphorylés par ces kinases. On pourra ainsi comparer la position de ces résidus avec les résidus connus pour être impliqués dans les interactions de l'émerine avec ses partenaires ou tout simplement les comparer aux résidus mutés dans les différentes envelopopathies. Camille Samson, étudiante en thèse dans mon équipe, est actuellement en train de tester l'impact de ces phosphorylations sur l'état oligomérique de l'émerine et plus particulièrement sur sa capacité à former des filaments.

Les interactions à l'INM importantes pour les propriétés mécaniques du noyau

Les interactions de l'émerine et de la lamine A avec BAF

Afin de vérifier le bon repliement de l'émerine et de BAF après renaturation dans l'urée, j'ai testé et observé l'interaction de ces deux protéines par RMN.

D'un autre côté, je n'ai obtenu aucune interaction entre BAF et la lamine A 389-646. Il se pourrait que ces deux protéines n'interagissent pas directement *in vitro* et que leur interaction dans la cellule nécessite des états d'oligomérisation spécifiques, des modifications post-traductionnelles ou encore la présence d'un troisième partenaire comme l'émerine, partenaire commun à la lamine A et BAF. Il est également possible que BAF n'interagisse qu'avec la prélamine A, comme suggéré précédemment^{224, 221}, et que cette interaction disparaisse avec la lamine A mature.

Les autres interactions de la lamine A avec SUN1, l'actine et l'émerine

Il avait été proposé dans la littérature que la lamine A 389-646 était capable d'interagir avec SUN1 1-139. J'ai pu montrer cette interaction et identifier les résidus de la lamine A impliqués dans cette interaction comme étant les résidus des régions désordonnées de cette queue des lamines et quelques résidus localisés à la surface de l'IgFold. C'est une surface différente du domaine IgFold de la lamine A qui semble interagir avec l'actine.

J'ai également montré une interaction entre la lamine A et plus particulièrement son domaine IgFold et l'émerine.

J'ai représenté les résidus affectés par chacun de ses partenaires sur la structure de l'IgFold de la lamine A ([Figure 141](#)).

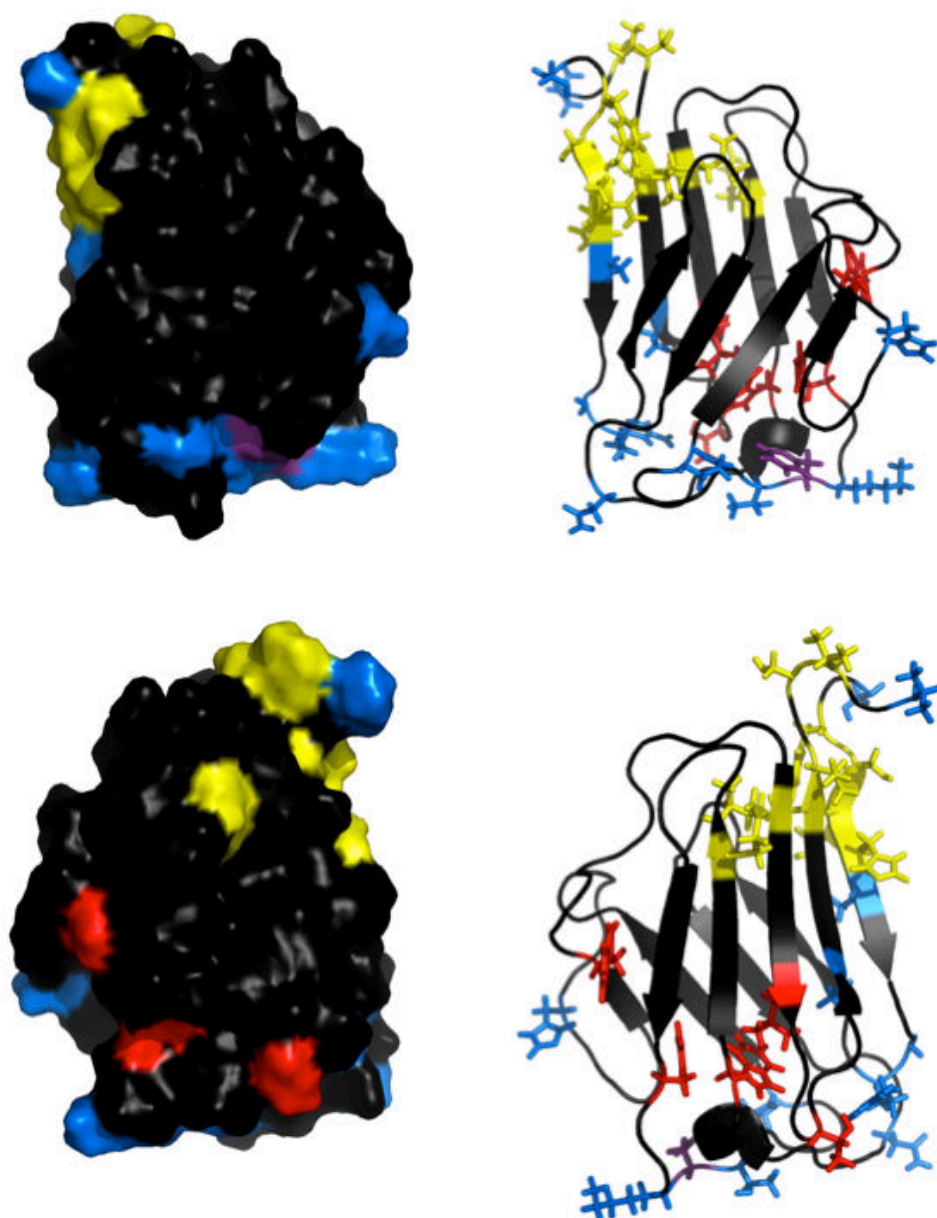


Figure 141 : Structure PDB de la lamine A 428-549 avec représentation des résidus impliqués dans l'interaction avec l'émerine, l'actine et SUN1

Vue de la structure PDB du domaine IgFold 428-549 de la lamine A en représentation surface et cartoon, chacune également représentée après une rotation de 180°. Les résidus de l'IgFold 429-548 (PDB : 1IVT) sont représentés en noir. Les résidus impliqués dans les interactions sont en couleur et leurs chaînes latérales sont représentées sous forme de sticks. **Les résidus affectés par la présence d'émerine 1-187 (F430, S431, Q432, H433, Q472, L526, L543, V544, S546 et V547) sont représentés en jaune**, **ceux affectés par la présence d'actine G (W467, F483, W514, L530 et T534) sont représentés en rouge** et les acides aminés affectés par la présence de SUN1 1-139 (S428, A434, G438, R439, N459, K486, T488, Q493, H506, A539 et V549) sont représentés en bleu. F487 est affecté par la présence d'actine G et de SUN1 1-139 et est par conséquent représenté en violet.

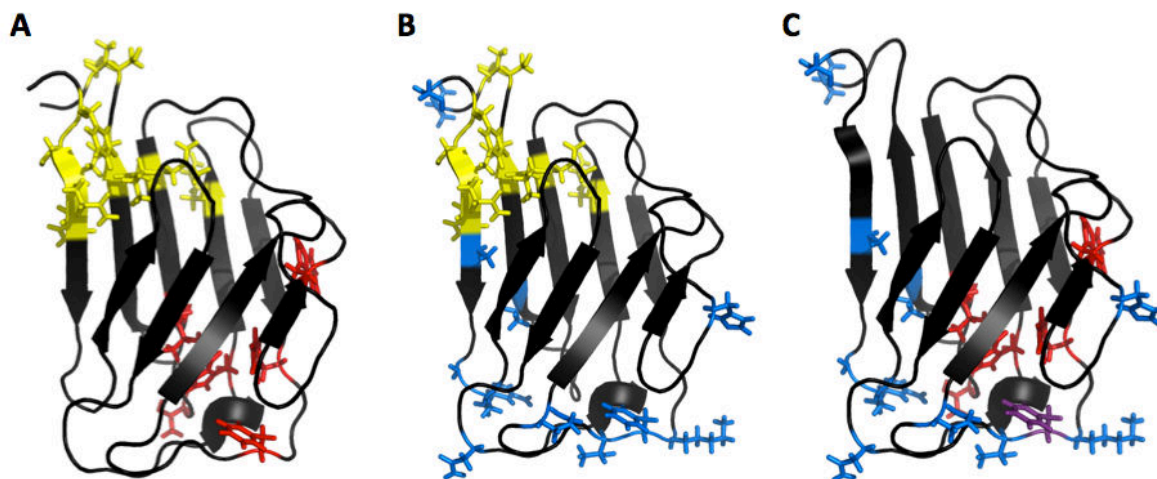


Figure 142 : Hypothèse de complexes à 3 protéines

Vue de la structure PDB du domaine IgFold 428-549 de la lamine A en représentation cartoon. Les résidus de l'IgFold 429-548 (PDB : 1IYT) sont représentés en noir. Les résidus impliqués dans les interactions sont en couleur et leurs chaînes latérales sont représentées sous forme de sticks. **Les résidus affectés par la présence d'émerine 1-187 sont représentés en jaune, ceux affectés par la présence d'actine G sont représentés en rouge et les acides aminés affectés par la présence de SUN1 1-139 sont représentés en bleu.** F487 est affecté par la présence d'actine ou SUN1 et est représenté en violet. A. Complexe lamine A / émerine / actine. B. Complexe lamine A / émerine / SUN1. C. Complexe lamine A / actine / SUN1.

L'émerine et l'actine G se lient à l'IgFold de la lamine A sur deux régions distinctes à l'opposé l'une de l'autre (Figure 142A). Il est donc possible que ces protéines interagissent en même temps sur la lamine.

De la même manière qu'avec l'actine, SUN1 et l'émerine semblent se lier à la lamine sur deux surfaces différentes. Le complexe lamine A / émerine / SUN1 n'est donc pas à exclure.

Comme toutes ces protéines interagissent les une avec les autres via différents domaines, il n'est pas exclu que des complexes à 3 ou 4 protéines existent dans la cellule (Figure 143). Étant donné les forces exercées par le cytosquelette sur l'enveloppe nucléaire, ce vaste réseau d'interactions et la présence de complexes à plusieurs protéines pourraient être critiques pour le maintien de l'intégrité nucléaire et pour le câblage entre le nucléosquelette et le cytosquelette.

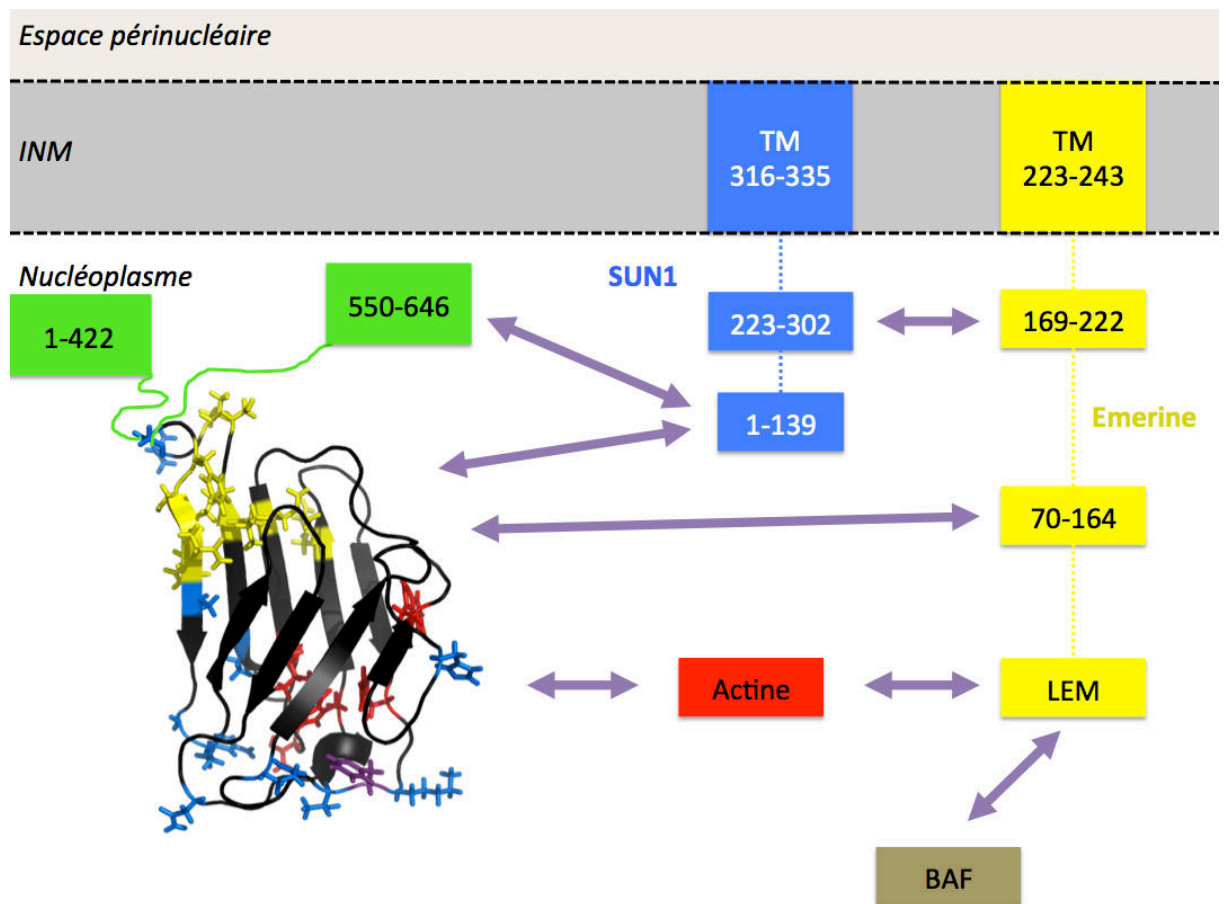


Figure 143 : Résumé schématique des interactions connues et observées dans cette thèse

La structure de l'IgFold 428-549 (PDB : 1IVT) est en représentation cartoon. Les résidus affectés par la présence d'émerine 1-187 sont représentés en jaune, ceux affectés par la présence d'actine G en rouge et ceux affectés par la présence de SUN1 en bleu. F487, affectés à la fois par la présence d'actine et de SUN1 est représenté en violet. Les régions désordonnées de part et d'autre de l'IgFold sont représentées par des traits en vert et la région N-terminale de la lamine A (1-422) est représentée par un carré vert. Les autres protéines sont représentées par différentes couleurs, SUN1 en bleu, l'émerine en jaune, l'actine nucléaire en rouge et BAF en marron. Les différentes régions de ces protéines impliquées dans les interactions sont représentées par des rectangles, reliés entre eux par des lignes en pointillés. Enfin chaque interaction est représentée par une flèche violette à deux sens. INM : Membrane nucléaire interne et TM : domaine transmembranaire.

Les résidus de l'IgFold dont les signaux RMN sont les plus affectés lors des interactions avec l'émerine et l'actine sont majoritairement des résidus enfouis dans la structure et participant au maintien de cette structure IgFold. Il se pourrait donc que ces interactions nécessitent ou induisent un dépliement partiel de l'IgFold. Dans un papier récent ¹⁵⁴, selon les auteurs le dépliement / repliement de l'IgFold jouerait un rôle dans les propriétés mécaniques du noyau ¹⁵⁴. De notre côté, nous avons observé que lors de l'interaction émerine - lamine A des pics supplémentaires apparaissent sur le spectre RMN de l'IgFold (en contact avec l'émerine) après 6 jours à 20°C et semblent correspondre à des résidus nouvellement désordonnés. Il est donc possible que la présence d'émerine induise un dépliement de l'IgFold. Une faible quantité d'urée est présente à la fin de la purification de l'émerine et peut varier d'un échantillon à l'autre considérant les paramètres difficiles à maîtriser comme la vitesse d'agitation, la température de la pièce ou encore l'âge et le nombre d'utilisation de la cassette de dialyse. Ces restes d'urée dans l'échantillon pourraient donc être responsables de la variabilité observée dans les expériences d'interaction émerine –lamine A.

Le rôle des régions déstructurées dans la construction plus longue de lamine A (389-646) est plus énigmatique. Elles sont très largement impliquées dans l'interaction avec SUN1 mais ne semblent avoir aucun rôle dans l'interaction avec l'actine et l'émerine. Des défauts de maturation de la lamine A pourraient déréguler l'interaction avec SUN1, comme suggéré précédemment ²²⁵.

PERSPECTIVES

Oligomérisation de l'émerine et liaison à ses partenaires

Les seules interactions observées entre l'émerine et la lamine A ont été obtenues sur l'émerine sortant de dialyse et incubée plusieurs jours à 20°C. Si l'interaction avec la lamine A nécessite un état oligomérique particulier de l'émerine, on peut imaginer que d'une purification à l'autre je n'obtiens pas la même quantité de cet oligomère, étant donné l'étape finale de purification qui est une série de dialyses et le temps d'incubation de l'échantillon après la purification et avant les expériences d'interaction, qui n'a pas toujours été contrôlé. À ce stade, il est donc absolument nécessaire de caractériser précisément quel état oligomérique de l'émerine est capable d'interagir avec l'IgFold de la lamine A, par des expériences d'ultracentrifugation analytiques par exemple. Il est également important de déterminer quelle forme oligomérique de l'émerine est capable d'interagir avec quelle forme oligomérique d'actine. Enfin, il faudrait éclaircir l'impact d'un dépliement partiel de l'IgFold sur l'interaction de la lamine avec l'émerine.

Une même étude sur SUN1 ?

Pour aller plus loin dans l'étude de l'interaction entre SUN1 et la lamine A, il faudrait tester de nouveau cette interaction en essayant de réaliser une titration (augmentation croissante de la quantité de SUN1) afin de pouvoir estimer l'affinité de cette interaction. Pour ce faire, je dois maîtriser la manipulation de mes constructions de SUN1 et donc caractériser structuralement ces constructions, comme je l'ai fait pour l'émerine : état d'oligomérisation, influence des conditions de tampon (pH, concentrations en sels) etc... C'est un travail de mise en place relativement conséquent, demandant énormément d'analyses par ultracentrifugation analytique, microscopie électronique à transmission ou encore RMN. Cela permettrait de déterminer quel état oligomérique de SUN1 interagit avec la lamine A, de confirmer que ce sont les parties déstructurées de queue C-terminale de la lamine A qui sont en interaction avec SUN1 1-139, et en maîtrisant la biochimie du fragment 1-355, il serait également possible d'étudier l'interaction de SUN1 avec l'émerine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. CONSTRUCTIONS UTILISÉES

Émerine

Les différents plasmides (pETM-13) contenant l'émerine humaine 1-187 ou 1-221 fusionnée à une étiquette de 8 histidines, clivable à la protéase TEV, ont été achetés chez Genscript. La séquence de ces plasmides a été optimisée pour la production dans *E.coli*. Les mutants S54F, Q133H, P183H, P183T, Del95-99 et plus tardivement P22L, DelK37 et T43I ont été obtenus par mutagenèse dirigée en utilisant le kit Quikchange (Agilent) sur la construction de l'émerine 1-187.

La lamine A

Les plasmides (pGEX) contenant les différentes constructions de lamine A étudiées m'ont été fournis par l'équipe du Prof. Howard J. Worman du Department of Medicine and Department of Pathology and Cell Biology à l'université de Columbia, New York. Ces plasmides codent pour une étiquette GST, un site de coupure à la thrombine et la construction de lamine A.

L'actine

L'actine G monomérique m'a été fournie produite et purifiée par l'équipe du Dr. Louis Renault au LEBS, CNRS de Gif-sur-Yvette.

SUN1

Le plasmide (pETM-13) contenant SUN1 humaine 1-355 fusionnée à une étiquette de 8 histidines, clivable à la protéase TEV, a été acheté chez Genscript avec ou sans le peptide GCN4 forçant la trimérisation. Les séquences de ces plasmides ont été optimisées pour la production dans *E.coli*. Les constructions plus courtes et mutées (1-208, 1-139, 1-114 et 1-114 C14S) ont été obtenues par mutagenèse dirigée en utilisant le kit Quikchange (Agilent) sur la construction de SUN1 1-355 sans GCN4.

BAF

Le plasmide (pETM-13) contenant BAF humaine fusionnée à une étiquette de 8 histidines, clivable à la protéase TEV, a été acheté chez Genscript. La séquence de ce plasmide a été optimisée pour la production dans *E.coli*.

II. CULTURES

Toutes les protéines ont été exprimées dans une souche d'*E. coli* BL21(DE3)Star. Pour les constructions de lamine A, les cultures ont été faites à 37°C et induites à une D.O. de 0.8 pendant 4h à 37°C par ajout de 0.5 mM d'IPTG. Pour toutes les autres constructions, les cultures ont été faites à 37°C et induites à une D.O. de 1 ou plus, O/N à 20°C, par ajout de 0.5 mM d'IPTG. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3 500 rpm pendant 20 minutes et chaque culot (correspondant à 800 mL ou 1 L de culture) sont resuspendus dans 20 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 5% glycérol, 1% Triton TX-100 et 10 mM PMSF) puis congelés à -80°C.

III. PURIFICATIONS

Lyses

Quelle que soit la protéine étudiée, la première étape de purification a toujours été la même et c'est ce que je nomme la « lyse classique » dans cette thèse. Le protocole est le suivant :

1. Décongélation lente des culots.
2. Sonication en plusieurs cycles de 30 pulsations séparées d'1 seconde à des puissances allant de 30 à 70%.
3. Incubation avec 2 µL de benzonase (Sigma).
4. Centrifugation à 20 000 rpm pendant 20 minutes.
5. Récupération du surnageant dans le cas des lames A et du culot pour toutes les autres protéines, produites en corps d'inclusion.

Pour les protéines produites en corps d'inclusion, des étapes supplémentaires sont nécessaires :

6. Solubilisation du culot dans le tampon C8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole et 8 M Urée) pendant 1h à température ambiante sur une roue.
7. Centrifugation à 20 000 rpm pendant 20 minutes.
8. Récupération du surnageant « urée ».

Purifications

Les constructions de lamine A, contenant une étiquette GST, sont purifiées grâce à une chromatographie d'affinité en utilisant une colonne GSTrap FF (GE Healthcare). La colonne est équilibrée dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8, **150 mM NaCl** et 1 mM DTT) puis le surnageant de la lyse est chargé sur la colonne. La colonne est ensuite lavée, d'abord avec le tampon A, puis avec le tampon B (50 mM Tris-HCl pH 8, **1 M NaCl** et 1 mM DTT) afin d'éliminer l'ADN contaminant et de nouveau avec le tampon A. La protéine est enfin éluée avec un gradient de tampon C (50 mM Tris-HCl pH 8, **150 mM NaCl**, 1 mM DTT et **10 mM de glutathion réduit**). Les constructions de lamine A subissent une dernière étape de purification qui est une étape de polissage par filtration sur gel dans le tampon désiré.

Pour toutes les autres constructions, contenant une étiquette de 8 histidines et pour lesquelles les protéines sont produites en corps d'inclusion, la seule étape de purification est une chromatographie d'affinité en utilisant une colonne HisTrap FF (GE Healthcare). La colonne est équilibrée dans le tampon C8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, **20 mM Imidazole** et **8 M Urée**) puis le surnageant de la lyse dans l'urée est chargé sur la colonne. La colonne est ensuite lavée avec le tampon C8 et la protéine est éluée sans gradient par ajout de 100% de tampon E8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, **1 M Imidazole** et **8 M Urée**). Les protéines obtenues sont ensuite, dépendamment des expériences, dialysées ou passées sur filtration sur gel afin d'éliminer l'urée et l'imidazole et de replier ces protéines.

IV. IMMUNOFLUORESCENCE (IF)

Les cellules ont été fixées avec 3% de paraformaldéhyde pendant 12 minutes à température ambiante, perméabilisées avec du PBS contenant 0.5% de triton TX-100 pendant 5 minutes à température ambiante et bloquées avec 2% de BSA diluée dans le PBS contenant 0.5% de triton TX-100. Les anticorps primaires utilisés sont détaillés dans les légendes des figures. L'ADN est marquée par du Hoechst 33258 (1 µg/ml).

V. PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA)

La technique de PLA a été utilisée pour détecter des proximités entre GFP-émerine - lamine A/C et GFP-émerine – FLAG-émerine. Après fixation, perméabilisation et blocage des cellules (comme pour l'IF), les anticorps primaires et secondaires ont été ajoutés (voir légendes des figures correspondantes) et incubés 30 minutes à température ambiante. Le réactif Duolink et les sondes colorées ont ensuite été ajoutés en suivant les instructions du fabricant (Olink, Bioscience). La microscopie confocale a été réalisée en utilisant un microscope LSM 700.

VI. ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE (UCA)

Les expériences de vitesse de sédimentation ont été réalisées en mesurant l'absorbance à 280 nm sur un trajet optique de 1.2 cm sur 360 µl d'échantillon. L'appareil utilisé est une ultracentrifugeuse analytique XLA70 (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) équipée d'un rotor An-60Ti et de cellules elles-mêmes équipées de pièces centrales à 2 canaux. 1 scan a été réalisé toutes les 5 minutes. L'ultracentrifugation est réalisée à 45 000 rpm (147 280xg) à une température de 20°C. L'analyse des résultats est réalisée avec le logiciel Sedfit²²⁶.

VII. SEC-MALS

100 µL d'échantillon d'émerine ont été injectés sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon désiré et contrôlée par un système HPLC (Shimadzu). Le débit utilisé est de 0.5 mL/min. La détection est réalisée grâce à différents détecteurs (WYATT technology) branchés en série :

- MiniDAWN TREOS : signal de diffraction laser (Laser Scattering, LS)
- QELS : signal de diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS)
- Optilab T-rEX : mesure de l'indice de réfraction différentiel (differential Refractive Index, dRI)

VIII. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

Les grilles de microscopie électronique utilisées possèdent 200 fenêtres et sont recouvertes d'un film de carbone (Agar Scientific). Le protocole de dépôt utilisé est le suivant :

- L'échantillon d'émerine est dilué entre 5 et 50 μM .
- 10 μL de cet échantillon sont déposés sur la grille, en position horizontale, et laissés pendant 30 secondes.
- 10 μL de contrastant (acétate d'uranyle à 1%) sont ajoutés à la goutte d'échantillon et le mélange échantillon/contrastant est retiré immédiatement à l'aide d'un morceau de papier Wathman n°4.
- 10 μL de contrastant (acétate d'uranyle à 1%) sont déposés sur la grille, en position horizontale, et laissés pendant 30 secondes.
- Le contrastant est retiré en laissant la grille au contact du papier Wathman pendant au moins 30 secondes.

Les images de microscopie ont été obtenues sur différents microscopes :

- CM120 (Philips), 120 kV, avec une caméra SSC (Gatan) dans l'équipe du Dr. Daniel Lévy (équipe Microscopie Moléculaire des Membranes) à l'Institut Curie, Paris. Images réalisées par le Dr. Daniel Lévy.
- EM900 (Zeiss), 80 kV, avec une caméra CDD Morada G2 (Olympus) sur la plateforme d'imagerie (Core Facility Cellular Imaging) du FMP, Berlin. Images réalisées par le Dr. Dmytrov Puchkov.
- JEM-1400Plus (JEOL), 120 kV, avec une caméra CCD SC1000 Orius (Gatan) sur la plateforme d'Imagif, CNRS, Gif-sur-Yvette. Images réalisées par moi-même.

IX. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À RÉFLEXION TOTALE ATTÉNUÉE (ATR-FTIR)

Les expériences ATR-FTIR ont été réalisées en déposant 10 μL d'échantillon d'émerine à 1.2 mM sur un spectromètre Bruker IFS88 (Bruker) composé de détecteurs MCT et DTGS permettant une mesure spectrale entre 800 et 6000 cm^{-1} .

X. FLUORESCENCE DE LA THIOFLAVINE

La formation des filaments d'émerine *in vitro* est suivie par fluorescence en ajoutant 10 μM de Thioflavine T (ThT) à un échantillon d'émerine à (entre 10 et 60 μM) dans des cuves en quartz Hellma (Sigma) contenant un volume de 300 μL et une longueur de trajet optique de 10 mm. Les mesures ont été faites sur un spectrofluorimètre FP6500 (Jasco) en excitant l'échantillon à 440 nm et en réalisant l'acquisition du spectre d'émission entre 400 et 600 nm.

XI. RMN DU LIQUIDE

Les expériences de RMN du liquide ont été réalisées à 20°C sur des spectromètres Bruker DRX600 et DRX700 équipés de cryoprobos TCI à triple résonance. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Topsin 3.1 (Bruker) et analysées à l'aide des logiciels Sparky3 (T. D. Goddard and D. G. Kneller, University of California, San Francisco) et CCPNMR²²⁷.

XII. RMN DU SOLIDE

Les spectres de RMN du solide ont été obtenus sur un spectromètre Bruker Avance III HD 800 à une température de 278 K. Une fréquence de 8 kHz a été utilisée pour la rotation à l'angle magique du rotor. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Topsin 3.2 (Bruker) et analysées à l'aide du logiciel CCPNMR²²⁸.

XIII. TITRATION CALORIMÉTRIQUE ISOTHERME (ITC)

Les expériences d'ITC ont été réalisées sur la plateforme de microcalorimétrie à l'institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire d'Orsay sur un calorimètre VP-ITC (Malvern). L'émerine a été introduite dans la seringue à une concentration de 200 μM et la lamine A 423-566 a été déposée dans la cellule à 20 μM . Les expériences ont été réalisées par injections successives de 10 μL d'émerine (première injection de 2 μL) dans la cellule avec un délai de 240 secondes entre chaque injection (180 secondes après la première injection). Tout au long des manipulations, l'échantillon contenu dans la cellule est agité à 310 rpm et thermostaté à 20°C.

RÉFÉRENCES

- 1 Alberts, B. *et al.* Biologie moléculaire de la cellule. (2007).
- 2 Cronshaw, J. M. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* (2002).
- 3 Allen, T. D. *et al.* A protocol for isolating *Xenopus* oocyte nuclear envelope for visualization and characterization by scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy (TEM). *Nat Protoc* (2007).
- 4 Fahrenkrog, B. *et al.* The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003).
- 5 Belgareh, N. *et al.* Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells. *The Journal of Cell Biology* (1997).
- 6 Bucci, M. *et al.* In vivo dynamics of nuclear pore complexes in yeast. *The Journal of Cell Biology* (1997).
- 7 Hawryluk-Gara, L. A. *et al.* Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Molecular Biology of the Cell* (2005).
- 8 Smythe, C. *et al.* Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *The EMBO Journal* (2000).
- 9 Schirmer, E. C. *et al.* Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* (2003).
- 10 Sosa, B. A. *et al.* LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins. *Cell* (2012).
- 11 Simon, D. N. *et al.* Partners and post-translational modifications of nuclear lamins. *Chromosoma* (2013).
- 12 Cohen, M. *et al.* Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends in Biochemical Sciences* (2001).
- 13 Melcer, S. *et al.* Invertebrate lamins. *Experimental Cell Research* (2007).
- 14 Benavente, R. *et al.* Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* (1985).
- 15 Lehner, C. F. *et al.* Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *The Journal of Cell Biology* (1987).
- 16 Prather, R. S. *et al.* Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biology of reproduction* (1989).
- 17 Goldman, A. E. *et al.* Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *The Journal of Cell Biology* (1992).
- 18 Lutz, R. J. *et al.* Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1992).
- 19 Thompson, L. J. *et al.* Identification of protein phosphatase 1 as a mitotic lamin phosphatase. *The Journal of biological chemistry* (1997).
- 20 Ito, H. *et al.* Nuclear envelope precursor vesicle targeting to chromatin is stimulated by protein phosphatase 1 in *Xenopus* egg extracts. *Experimental Cell Research* (2007).
- 21 Gerace, L. *et al.* The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* (1980).
- 22 Stick, R. *et al.* The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* (1988).
- 23 Dechat, T. *et al.* Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development* (2008).
- 24 Barrowman, J. *et al.* Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Biol Cell* (2008).
- 25 Navarro, C. L. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and

- accumulation of Lamin A precursors. *Human Molecular Genetics* (2005).
- 26 Agarwal, A. K. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Human Molecular Genetics* (2003).
 - 27 Shackleton, S. *et al.* Compound heterozygous ZMPSTE24 mutations reduce prelamin A processing and result in a severe progeroid phenotype. *J Med Genet* (2005).
 - 28 Quigley, A. *et al.* The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies. *Science* (2013).
 - 29 Stuurman, N. *et al.* Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *Journal of Structural Biology* (1998).
 - 30 Krimm, I. *et al.* The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure (London, England : 1993)* (2002).
 - 31 Dhe-Paganon, S. *et al.* Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin. *Journal of Biological Chemistry* (2002).
 - 32 Strelkov, S. V. *et al.* Crystal Structure of the Human Lamin A Coil 2B Dimer: Implications for the Head-to-tail Association of Nuclear Lamins. *Journal of Molecular Biology* (2004).
 - 33 Ruan, J. *et al.* Crystal structures of the coil 2B fragment and the globular tail domain of human lamin B1. *FEBS Letters* (2012).
 - 34 Mattout, A. *et al.* Nuclear lamins, diseases and aging. *Current Opinion in Cell Biology* (2006).
 - 35 Kapinos, L. E. *et al.* Characterization of the head-to-tail overlap complexes formed by human lamin A, B1 and B2 "half-minilamin" dimers. *J Mol Biol* (2010).
 - 36 Heitlinger, E. *et al.* Expression of chicken lamin B2 in Escherichia coli: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *The Journal of Cell Biology* (1991).
 - 37 Gieffers, C. *et al.* In vitro reconstitution of recombinant lamin A and a lamin A mutant lacking the carboxy-terminal tail. *Eur J Cell Biol* (1991).
 - 38 Aebi, U. *et al.* The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* (1986).
 - 39 Stierlé, V. *et al.* The Carboxyl-Terminal Region Common to Lamins A and C Contains a DNA Binding Domain †. *Biochemistry* (2003).
 - 40 Schermelleh, L. *et al.* Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* (2008).
 - 41 Shimi, T. *et al.* The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* (2008).
 - 42 Zastrow, M. S. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *Journal of Cell Science* (2004).
 - 43 Starr, D. A. ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *Journal of Cell Science* (2003).
 - 44 Zhang, Q. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* (2005).
 - 45 Starr, D. A. *et al.* Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* (2002).
 - 46 Lee, K. K. *et al.* Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* (2002).
 - 47 Simon, D. N. *et al.* The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nature Publishing Group* (2011).
 - 48 Stewart-Hutchinson, P. J. *et al.* Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res* (2008).
 - 49 Crisp, M. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *The Journal of Cell Biology* (2006).
 - 50 Haque, F. *et al.* Mammalian SUN Protein Interaction Networks at the Inner Nuclear Membrane and Their Role in Laminopathy Disease Processes. *Journal of Biological Chemistry* (2010).
 - 51 Gruenbaum, Y. *et al.* Lamins: the structure and protein complexes. *Current opinion in cell biology* (2015).
 - 52 Jamin, A. *et al.* Barrier to Autointegration Factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure,

- genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. *Current opinion in cell biology* (2015).
- 53 Brachner, A. *et al.* Evolvement of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery. *Biochemical Society transactions* (2011).
- 54 Kielkopf, C. L. *et al.* U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes & development* (2004).
- 55 Scheer, U. *et al.* Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* (1984).
- 56 Vartiainen, R. G. a. M. K. To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2013).
- 57 Hofmann, W. A. *et al.* SUMOylation of nuclear actin. *The Journal of Cell Biology* (2009).
- 58 Broers, J. L. V. *et al.* Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological reviews* (2006).
- 59 Gruenbaum, Y. *et al.* The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2005).
- 60 Holmer, L. *et al.* Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2001).
- 61 Finlan, L. E. *et al.* Recruitment to the Nuclear Periphery Can Alter Expression of Genes in Human Cells. *PLoS Genetics* (2008).
- 62 Mekhail, K. *et al.* The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010).
- 63 Shevelyov, Y. Y. *et al.* The B-type lamin is required for somatic repression of testis-specific gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2009).
- 64 Meister, P. *et al.* The spatial dynamics of tissue-specific promoters during *C. elegans* development. *Genes & Development* (2010).
- 65 Jost, K. L. *et al.* Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? *Chromosoma* (2012).
- 66 Collins, B. C. C. a. F. S. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* (2006).
- 67 Sullivan, T. *et al.* Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *The Journal of Cell Biology* (1999).
- 68 Schermelleh, L. *et al.* Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science* (2008).
- 69 Pickersgill, H. *et al.* Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nature Genetics* (2006).
- 70 Schmid, M. *et al.* Nup-PI: The Nucleopore-Promoter Interaction of Genes in Yeast. *Molecular Cell* (2006).
- 71 Taddei, A. *et al.* Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* (2006).
- 72 Akhtar, A. *et al.* The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature Reviews Genetics* (2007).
- 73 Vaquerizas, J. M. *et al.* Nuclear Pore Proteins Nup153 and Megator Define Transcriptionally Active Regions in the *Drosophila* Genome. *PLoS Genetics* (2010).
- 74 Hofmann, W. A. *et al.* Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* (2004).
- 75 Zhu, X. *et al.* Actin is closely associated with RNA polymerase II and involved in activation of gene transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004).
- 76 Guelen, L. *et al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* (2008).
- 77 de Wit, E. *et al.* Chromatin domains in higher eukaryotes: insights from genome-wide mapping studies. *Chromosoma* (2008).
- 78 Zullo, J. M. *et al.* DNA Sequence-Dependent Compartmentalization and Silencing of Chromatin at the Nuclear Lamina. *Cell* (2012).
- 79 Cai, M. *et al.* Solution NMR structure of the barrier-to-autointegration factor-Emerin complex. *The*

Journal of biological chemistry (2007).

80 Montes de Oca, R. *et al.* Barrier-to-Autointegration Factor Proteome Reveals Chromatin-Regulatory Partners. *PLoS ONE* (2009).

81 Somech, R. The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2 interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *Journal of Cell Science* (2005).

82 Demmerle, J. *et al.* The nuclear envelope protein emerlin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *Journal of Biological Chemistry* (2012).

83 Milon, B. C. *et al.* Role of Histone Deacetylases in Gene Regulation at Nuclear Lamina. *PLoS ONE* (2012).

84 Li, B. *et al.* The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* (2007).

85 Krishnan, V. *et al.* Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *PNAS* (2011).

86 Liu, B. *et al.* Resveratrol Rescues SIRT1-Dependent Adult Stem Cell Decline and Alleviates Progeroid Features in Laminopathy-Based Progeria. *Cell Metabolism* (2012).

87 Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin. *Molecular Cell* (2004).

88 Lu, X. *et al.* Drosophila H1 Regulates the Genetic Activity of Heterochromatin by Recruitment of Su(var)3-9. *Science* (2013).

89 Liu, B. *et al.* Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nature Communications* (2013).

90 Vaquero, A. *et al.* SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* (2007).

91 Kennedy, B. K. *et al.* Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes & Development* (2000).

92 Moir, R. D. *et al.* Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *The Journal of Cell Biology* (1994).

93 Shumaker, D. K. *et al.* The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication. *The Journal of Cell Biology* (2008).

94 Heessen, S. *et al.* The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO reports* (2007).

95 Mansharamani, M. *et al.* Direct Binding of Nuclear Membrane Protein MAN1 to Emerin in Vitro and Two Modes of Binding to Barrier-to-Autointegration Factor. *Journal of Biological Chemistry* (2005).

96 Grosse, R. *et al.* To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature Publishing Group* (2013).

97 Broers, J. L. *et al.* Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* (2006).

98 Gruenbaum, Y. *et al.* The nuclear lamina comes of age. *Nature Publishing Group* (2005).

99 Finlan, L. E. *et al.* Recruitment to the Nuclear Periphery Can Alter Expression of Genes in Human Cells. *PLoS Genet* (2008).

100 Mekhail, K. *et al.* The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nature Publishing Group* (2010).

101 Shevelyov, Y. Y. *et al.* The B-type lamin is required for somatic repression of testis-specific gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2009).

102 Capell, B. C. *et al.* Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* (2006).

103 Pickersgill, H. *et al.* Characterization of the Drosophila melanogaster genome at the nuclear lamina. *Nat Genet* (2006).

104 Akhtar, A. *et al.* The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* (2007).

105 Vaquerizas, J. M. *et al.* Nuclear Pore Proteins Nup153 and Megator Define Transcriptionally Active Regions in the Drosophila Genome. *PLoS Genet* (2010).

106 Hofmann, W. A. *et al.* Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by

- RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* (2004).
- 107 Zullo, J. M. *et al.* DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell* (2012).
- 108 Krishnan, V. *et al.* Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2011).
- 109 Liu, B. *et al.* Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nat Comms* (2013).
- 110 Willert, K. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development* (2006).
- 111 Wheeler, M. A. *et al.* Identification of an emerin-- β -catenin complex in the heart important for intercalated disc architecture and β -catenin localisation. *Cell. Mol. Life Sci.* (2009).
- 112 Heessen, S. *et al.* The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep* (2007).
- 113 Barascu, A. *et al.* Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* (2012).
- 114 MAO, Z. *et al.* Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* (2008).
- 115 Liu, Y. *et al.* Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *The FASEB Journal* (2007).
- 116 Redwood, A. B. *et al.* Regulating the levels of key factors in cell cycle and DNA repair: new pathways revealed by lamins. *Cell Cycle* (2011).
- 117 Singh, M. *et al.* Lamin A/C depletion enhances DNA damage-induced stalled replication fork arrest. *Mol Cell Biol* (2013).
- 118 Olins, A. L. *et al.* Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol* (2004).
- 119 Tzur, Y. B. *et al.* SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006).
- 120 Liu, J. *et al.* Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Molecular Biology of the Cell* (2000).
- 121 Lenz-Böhme, B. *et al.* Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *The Journal of Cell Biology* (1997).
- 122 Lammerding, J. *et al.* Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* (2004).
- 123 Dahl, K. N. *et al.* Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res* (2008).
- 124 Worman, H. J. *et al.* How do mutations in lamins A and C cause disease? *J. Clin. Invest.* (2004).
- 125 Newport, J. W. *et al.* A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *The Journal of Cell Biology* (1990).
- 126 Goldberg, M. W. *et al.* Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization. *Journal of Cell Science* (2008).
- 127 Broers, J. L. *et al.* Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleocyto-skeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* (2004).
- 128 Nikolova, V. *et al.* Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C--deficient mice. *J. Clin. Invest.* (2004).
- 129 Ralle, T. Intranuclear membrane structure formations by CaaX-containing nuclear proteins. *Journal of Cell Science* (2004).
- 130 Prufert, K. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *Journal of Cell Science* (2004).
- 131 Lammerding, J. *et al.* Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *The Journal of biological chemistry* (2006).
- 132 Liu, J. *et al.* MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America* (2003).
- 133 Margalit, A. *et al.* Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005).
- 134 Henderson, J. T. *et al.* Direct Measurement of Intranuclear Strain Distributions and RNA Synthesis in Single Cells Embedded within Native Tissue. *BPJ* (2013).
- 135 Burke, B. *et al.* Nuclei Take a Position: Managing Nuclear Location. *Developmental Cell* (2009).
- 136 Starr, D. A. *et al.* Interactions Between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2010).
- 137 Gundersen, G. G. *et al.* Nuclear Positioning. *Cell* (2013).
- 138 Zhang, X. *et al.* SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron* (2009).
- 139 Schneider, M. *et al.* Molecular mechanisms of centrosome and cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope. *Cell. Mol. Life Sci.* (2010).
- 140 Yu, J. *et al.* KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Human Molecular Genetics* (2011).
- 141 Horn, H. F. *et al.* A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J Cell Biol* (2013).
- 142 Tikhonenko, I. *et al.* A kinesin-mediated mechanism that couples centrosomes to nuclei. *Cell Mol Life Sci* (2013).
- 143 Zhang, Q. *et al.* Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *Journal of Cell Science* (2001).
- 144 Luxton, G. W. *et al.* Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* (2010).
- 145 Kutscheidt, S. *et al.* FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat Cell Biol* (2014).
- 146 Gomes, E. R. *et al.* Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes MTOC Polarization in Migrating Cells. *Cell* (2005).
- 147 Borrego-Pinto, J. *et al.* Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *Journal of Cell Science* (2012).
- 148 Ostlund, C. *et al.* Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *Journal of Cell Science* (2009).
- 149 Folker, E. S. *et al.* Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2011).
- 150 Chang, W. *et al.* Emerin organizes actin flow for nuclear movement and centrosome orientation in migrating fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* (2013).
- 151 Gudise, S. *et al.* Samp1 is functionally associated with the LINC complex and A-type lamina networks. *Journal of Cell Science* (2011).
- 152 Guilluy, C. *et al.* Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol* (2014).
- 153 Swift, J. *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* (2013).
- 154 Swift, J. *et al.* The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *Journal of Cell Science* (2014).
- 155 Omary, M. B. *et al.* 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends in Biochemical Sciences* (2006).
- 156 Lombardi, M. L. *et al.* Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem. Soc. Trans* (2011).
- 157 Zwerger, M. *et al.* Myopathic lamin mutations impair nuclear stability in cells and tissue and disrupt

- nucleo-cytoskeletal coupling. *Human Molecular Genetics* (2013).
- 158 Ho, C. Y. *et al.* Lamin A/C and emerin regulate MKL1--SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* (2013).
- 159 Holaska, J. M. *et al.* Emerin Caps the Pointed End of Actin Filaments: Evidence for an Actin Cortical Network at the Nuclear Inner Membrane. *Plos Biol* (2004).
- 160 Wang, Z. *et al.* Extensive Crosstalk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis. *Science Signaling* (2010).
- 161 Daub, H. *et al.* Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell* (2008).
- 162 Malik, R. *et al.* Quantitative Analysis of the Human Spindle Phosphoproteome at Distinct Mitotic Stages. *J. Proteome Res.* (2009).
- 163 Wang, B. *et al.* Evaluation of the Low-Specificity Protease Elastase for Large-Scale Phosphoproteome Analysis. *Anal. Chem.* (2008).
- 164 Olsen, J. V. *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* (2010).
- 165 Vergnes, L. *et al.* Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004).
- 166 Coffinier, C. *et al.* Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2010).
- 167 Takamori, Y. *et al.* Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* (2007).
- 168 Coffinier, C. *et al.* Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons. *Molecular Biology of the Cell* (2011).
- 169 Kim, Y. *et al.* Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science* (2011).
- 170 Kuga, T. *et al.* Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Experimental Cell Research* (2010).
- 171 Peter, A. *et al.* Evolution of the lamin protein family. *nucleus* (2014).
- 172 Heald, R. *et al.* Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* (1990).
- 173 Peter, M. *et al.* In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* (1990).
- 174 Ward, G. E. *et al.* Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* (1990).
- 175 Eggert, M. *et al.* Identification of phosphorylation sites on murine nuclear lamin C by RP-HPLC and microsequencing. *FEBS Letters* (1991).
- 176 Enoch, T. *et al.* p34cdc2 acts as a lamin kinase in fission yeast. *The Journal of Cell Biology* (1991).
- 177 Thompson, L. J. *et al.* betaII protein kinase C is required for the G2/M phase transition of cell cycle. *The Journal of biological chemistry* (1996).
- 178 Schneider, U. *et al.* Phosphorylation of the Major Drosophila Lamin In Vivo: Site Identification during Both M-Phase (Meiosis) and Interphase by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry †. *Biochemistry* (1999).
- 179 Hocevar, B. A. *et al.* Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *The Journal of biological chemistry* (1993).
- 180 Collas, P. Sequential PKC- and Cdc2-mediated phosphorylation events elicit zebrafish nuclear envelope disassembly. *Journal of Cell Science* (1999).
- 181 Buendia, B. *et al.* Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* (2001).

- 182 Eggert, M. *et al.* Identification of novel phosphorylation sites in murine A-type lamins. *European journal of biochemistry / FEBS* (1993).
- 183 Cenni, V. *et al.* Lamin A Ser404 Is a Nuclear Target of Akt Phosphorylation in C2C12 Cells. *J. Proteome Res.* (2008).
- 184 Dittmer, T. A. *et al.* The lamin protein family. *Genome biology* (2011).
- 185 Mitsuhashi, H. *et al.* Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *Journal of Cell Science* (2010).
- 186 Scharner, J. *et al.* Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations. *Human Mutation* (2011).
- 187 Astejada, M. N. *et al.* Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases* (2007).
- 188 Pekovic, V. *et al.* Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell* (2011).
- 189 Sieprath, T. *et al.* Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2012).
- 190 Simon, D. N. *et al.* Lamin A tail modification by SUMO1 is disrupted by familial partial lipodystrophy-causing mutations. *Molecular Biology of the Cell* (2013).
- 191 Kim, S. C. *et al.* Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. *Molecular Cell* (2006).
- 192 Glozak, M. A. *et al.* Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* (2005).
- 193 Berk, J. M. *et al.* The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucleus* (2013).
- 194 Tifft, K. E. *et al.* Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerin by Src, Abl and other kinases. *Journal of Cell Science* (2009).
- 195 Roberts, R. C. *et al.* The Emery-Dreifuss muscular dystrophy associated-protein emerin is phosphorylated on serine 49 by protein kinase A. *FEBS J* (2006).
- 196 Bukong, T. N. *et al.* Lentivirus-associated MAPK/ERK2 phosphorylates EMD and regulates infectivity. *Journal of General Virology* (2010).
- 197 Berk, J. M. *et al.* O-Linked -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Regulates Emerin Binding to Barrier to Autointegration Factor (BAF) in a Chromatin- and Lamin B-enriched "Niche". *Journal of Biological Chemistry* (2013).
- 198 Schreiber, K. H. *et al.* When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell* (2013).
- 199 Helbling-Leclerc, A. *et al.* Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *European journal of human genetics : EJHG* (2002).
- 200 Disopred 2.0, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>
- 201 Fairley, E. A. *et al.* The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *Journal of Cell Science* (1999).
- 202 Ellis, J. A. *et al.* Changes at P183 of emerin weaken its protein-protein interactions resulting in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Human genetics* (1999).
- 203 Mora, M. *et al.* X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy can be diagnosed from skin biopsy or blood sample. *Annals of neurology* (1997).
- 204 Ellis, J. A. *et al.* Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *Journal of Cell Science* (1998).
- 205 Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine* (2009).
- 206 String 10, <http://string-db.org/>
- 207 Sakaki, M. *et al.* Interaction between emerin and nuclear lamins. *Journal of biochemistry* (2001).
- 208 Vaughan, A. *et al.* Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *Journal of Cell Science* (2001).
- 209 Clements, L. *et al.* Direct Interaction between Emerin and Lamin A. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications (2000).

210 Manilal, S. *et al.* The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane
protein. *Human Molecular Genetics* (1996).

211 Manilal, S. *et al.* Distribution of emerin and lamins in the heart and implications for Emery-Dreifuss
muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* (1999).

212 Wolff, N. *et al.* Structural analysis of emerin, an inner nuclear membrane protein mutated in X-linked
Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *FEBS Letters* (2001).

213 Berk, J. M. *et al.* The molecular basis of emerin-emerin and emerin-BAF interactions. *Journal of Cell
Science* (2014).

214 KinasePhos2, <http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/>

215 Psipred, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

216 Dialynas, G. *et al.* LMNA variants cause cytoplasmic distribution of nuclear pore proteins in
Drosophila and human muscle. *Human Molecular Genetics* (2012).

217 Haque, F. *et al.* SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical
connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology* (2006).

218 Verstraeten, V. L. *et al.* The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility
to oxidative stress. *J Cell Mol Med* (2009).

219 Shackleton, S. *et al.* LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* (2000).

220 Decaudain, A. *et al.* New Metabolic Phenotypes in Laminopathies: LMNA Mutations in Patients with
Severe Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2007).

221 Capanni, C. *et al.* Familial partial lipodystrophy, mandibuloacral dysplasia and restrictive dermopathy
feature barrier-to-autointegration factor (BAF) nuclear redistribution. *Cell Cycle* (2012).

222 Puente, X. S. *et al.* Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause
of a hereditary progeroid syndrome. *Am J Hum Genet* (2011).

223 Bengtsson, L. *et al.* Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding
to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Molecular Biology of the Cell* (2006).

224 Capanni, C. *et al.* Lamin A precursor induces barrier-to-autointegration factor nuclear localization. *Cell
Cycle* (2010).

225 Chen, C.-Y. *et al.* Accumulation of the Inner Nuclear Envelope Protein Sun1 Is Pathogenic in Progeric
and Dystrophic Laminopathies. *Cell* (2012).

226 Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation
and lamm equation modeling. *BPJ* (2000).

227 Vranken, W. F. *et al.* The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software
pipeline. *Proteins* (2005).

228 Stevens, T. J. *et al.* A software framework for analysing solid-state MAS NMR data. *J Biomol NMR*
(2011).

ANNEXE

Article soumis dans Human Molecular Genetics :

Herrada *et al.*, Nuclear envelope emerin self-assembly and defects in disease.

Isaline Herrada¹, Camille Samson¹, Christophe Velours², Louis Renault², Cecilia Östlund³, Pierre Chervy¹, Dmytro Puchkov⁴, Howard J Worman³, Brigitte Buendia⁵ and Sophie Zinn-Justin^{1*}

¹ Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA Saclay Bât. 144, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

² Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS Bât.34, 1 avenue de la terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

³ Department of Medicine and Department of Pathology and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, 630 West 168th Street, New York, NY, 10032, USA

⁴ Department of Molecular Pharmacology and Cell Biology, Leibniz-Institut für Molecular Pharmakologie (FMP), 13125 Berlin, Germany

⁵ Laboratoire de Physiologie du Muscle Strié, Université Paris Diderot-Paris 7, CNRS, UMR 8251, Institut de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, 4 rue M.A. Lagroua Weill Halle, 75205 Paris Cedex 13, France

* To whom correspondence should be addressed: Sophie Zinn-Justin, I2BC CNRS / Univ. Paris South & IBITECS CEA, CEA Saclay Bât 144, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Tel.: +33(0)169083026; Fax: +33(0)169084712; Email: sophie.zinn@cea.fr

Abstract

The gene encoding the integral inner nuclear membrane protein emerin is mutated in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy, a condition characterized by joint contractures, regional skeletal muscle wasting and cardiomyopathy. Most mutations are nonsense or frameshift mutations that lead to the absence of emerin in cells. Only very few cases are due to missense or short in-frame deletions. Molecular mechanisms explaining the corresponding emerin variants loss of function are poorly understood. Five of these variants are altered in emerin's nucleoplasmic region from residue 1 to residue 187 (EmN) that is mostly intrinsically disordered. We now demonstrate that this EmN region self-assembles *in vitro*. Increases in concentration and temperature favor the formation of long curvilinear filaments with diameters of approximately 10 nm, as observed by electron microscopy. Assembly of these filaments is also revealed through progressive Thioflavin-T binding and formation of β -structures. Analysis of the assembly properties of five EmN variants showed that del95-99 and Q133H impact filament assembly capacities. In cells, these variants are located at the nuclear envelope but the corresponding quantities of emerin-emerin and emerin-lamin proximities are decreased compared to wild-type protein. Furthermore, variant P183H favors EmN aggregation *in vitro* and variant P183T provokes emerin accumulation in cytoplasmic foci in cells. We propose that substitution of residue Pro183 favors oligomerization involving a region between residues 187 and 220, thus leading to emerin aggregation and mislocalization in cells.

Introduction

In the metazoan nucleus, the genome is surrounded by the nuclear envelope, containing a double lipid membrane and a large number of proteins. A filamentous protein meshwork called the nuclear lamina lines the inner nuclear membrane. It is primarily composed of intermediate filament proteins called A-type (lamin A/C) and B-type lamins. It is anchored to the nuclear membrane by an extensive array of inner nuclear membrane proteins. Lamins and inner nuclear membrane proteins contribute to the architecture of the nuclear envelope. Emerin is one of these inner nuclear membrane proteins. Its gene was discovered in 1994 because it is mutated in patients with an X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD; (1)). Its mRNA shows ubiquitous tissue distribution with the highest expression in skeletal and cardiac muscles. In 1996, availability of anti-emerin antibodies enabled localization of the protein at the nuclear membrane (2, 3). More precisely, emerin is anchored at the inner nuclear membrane via its hydrophobic C-terminal domain from amino acid 223 to amino acid 243 (4). The fragment of emerin from amino acid 117 to 170 is sufficient for nuclear accumulation but only the fragment from amino acid 3 to 170 is capable of targeting an integral membrane protein to the inner nuclear membrane (5). In the heart and cultured cardiomyocytes, emerin might additionally be associated with intercalated discs (6). Thus, it could play a ubiquitous role in association of the nuclear membrane with the lamins and a tissue-specific role in heart in membrane anchorage to the cytoskeleton.

Emerin interacts with several proteins essential for cytoplasmic and nuclear structure and chromatin organization. Binding partners include lamin A/C, B-type lamins, actin, BAF and lamina-associated polypeptide 1 (7-11). Emerin interaction with lamin A/C was revealed by several teams and is supported by the fact that a large number of mutations in lamin A/C also cause EDMD (12). Emerin generally colocalizes with lamins, being mainly at the nuclear periphery in interphase (13). Furthermore, lamin A is essential for anchorage of emerin to the inner nuclear membrane (14). However, emerin and lamins do not remain colocalized during mitosis, demonstrating that their interaction is regulated in a cell-cycle manner. Emerin also binds the integral inner nuclear membrane protein lamina-associated polypeptide 1, which similarly associates with lamins and causes muscular dystrophy and cardiomyopathy when deleted from striated muscle (11). Emerin and lamin A/C further bind actin at the late stages of myotube differentiation and in mature muscle and these interactions are regulated by phosphorylation (15). Wilson and co-workers proposed that emerin region between residues 1 and 221 caps the pointed end of actin filaments (16). Lammerding and co-workers showed that emerin regulates the activity of the mechanosensitive transcription factor megakaryoblastic leukaemia 1, a myocardin family member that is pivotal in cardiac development and function, through modulation of nuclear and cytoskeletal actin polymerization (17). Furthermore, emerin organizes actin flow for centrosome orientation and nuclear movement in migrating cells (18). Emerin is also tyrosine phosphorylated after force is applied on isolated nuclei and this event mediates the nuclear mechanical response to tension (19). As emerin-deficient mouse embryo fibroblasts have apparently normal nuclear mechanics but impaired expression of mechanosensitive genes in response to strain, it has been suggested that disease-causing loss of function mutations act through altered transcriptional regulation and not by increasing nuclear fragility (20). Interaction of emerin with the DNA-bridging protein BAF functions in nuclear membrane targeting to chromatin and chromatin decondensation during nuclear assembly (21) and mitotic phosphorylation regulates the emerin-BAF interaction (22, 23).

Most mutations in the gene encoding emerin in patients with X-linked EDMD are nonsense or out-of-frame mutations that lead to the absence of emerin in patient cells (24). Only very few EDMD cases are due to missense or short in-frame deletions. Attempts to describe the impact of these mutations on emerin structure and binding properties have been hampered by difficulties in obtaining pure and soluble fragments of the emerin nucleoplasmic region from amino acid 1 to 221 (25). The three-dimensional structure of the emerin N-terminal LEM domain, from amino acid 1 to 45, has been solved (26) and a model of its structure in complex with a BAF dimer has been proposed (27). However, it was demonstrated in HeLa cells that the LEM domain and distal tyrosines (a.a. 59, 74, 95, 161) contribute to BAF binding (28). The region of emerin from amino acid 46 to 221 is predicted mainly intrinsically disordered (29). It contains the lamin and actin binding regions of emerin. It also comprises four positions (a.a 54, 95-99, 133, 183) whose substitution or deletion do not hinder emerin expression but cause EDMD (7, 30-32). The structural consequences of these changes in the protein are yet unknown. They could preclude specific emerin modification events or locally modify the three dimensional structure and conformational plasticity of the protein. They could also affect assembly of protein complexes involving emerin, either by altering emerin oligomerization and/or hindering partner recognition.

We now present a biophysical analysis of the nucleoplasmic region of emerin, describing its self-assembly properties and providing novel data on the architecture of emerin oligomers. We show that this emerin region forms filaments *in vitro*. From the comparison between results obtained *in vitro* and in cells on the full-length emerin protein, we discuss mechanisms that may lead to loss of function of emerin variants with amino acid substitutions or a small deletion associated to X-linked EDMD.

Results

The region of emerin from amino acid 1 to 187 is able to self-associate either through disulfide bridge formation or via hydrophobic interactions – We produced two recombinant fragments of emerin in *E. coli*: the whole nucleoplasmic region preceding the transmembrane domain from amino acid 1 to 221 (EmN0) and a smaller nucleoplasmic fragment from amino acid 1-187 (EmN) (Figure 1A,B). Bioinformatics analysis using the Disopred3 webserver predicted that, outside of the LEM domain, these fragments, which include amino acid substitutions and deletions in expressed disease-associated emerin variants, are essentially intrinsically disordered (Figure 1C). However, three regions show a tendency for local order (Metadisorder score lower than 0.7); they comprise residues 74 to 106, residues 159 to 186 and residues 203 to 208, respectively. The two first regions are rich in conserved hydrophobic residues (Suppl. Figure 1). One of these regions contains the residues deleted in the EDMD-associated variant del95-99 (blue squared in Suppl. Figure 1). The capacities of these regions to locally adopt preferred 3D structures are currently unknown.

As EmN0 and EmN are mainly present in inclusion bodies when expressed in bacterial cells, we purified these fragments by affinity chromatography in 8 M urea. The two fragments were then refolded when dialyzed in Tris 50 mM (pH 6.8), NaCl 150 mM. EmN0 was essentially only obtained as aggregates in all tested conditions, as previously observed (25). Therefore, we decided to use the more soluble EmN for the rest of our study. Analysis of the NMR ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of refolded EmN showed that most of signals have a ^1H chemical shift comprised between 7.8 and 8.4 ppm

(Figure 1D). Such low dispersion of the backbone ^1H resonances suggests that EmN is largely unstructured. Moreover, analysis of the NMR $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ nOe experiment confirmed that EmN is highly flexible in solution: a large number of ^1H - ^{15}N correlations are absent from the saturated experiment spectrum when compared to the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum (Figure 1D).

We next tested the impact of the refolding buffer on emerlin solubility and oligomerization by analytical ultracentrifugation (Figure 2A). In Tris 20 mM (pH 8.0), EmN at 20 μM exists mainly as two different species in solution, as observed in sedimentation velocity experiments. These species are characterized by sedimentation coefficients of 2.2 and 3.3 S, as well as form factors f/f_0 of 1.52 and 1.58, respectively. They correspond to elongated monomeric and dimeric EmN, as confirmed by sedimentation equilibrium experiments (Suppl. Figure 2). Non-denaturing SDS-PAGE analysis of the EmN samples in the presence of increasing β -mercaptoethanol concentrations showed that the unique cysteine of EmN (Cys147) is responsible for dimerization through disulfide bridge formation (Figure 2B).

Increasing the salt concentration close to physiological ionic strength favored the formation of larger molecular mass oligomers and/or aggregates of emerlin (Table in Figure 2A) that were too large to be observed by NMR. The presence of these large species at high salt concentration suggested that hydrophobic interactions play a role in emerlin self-assembly and/or aggregation. Similar experiments carried out after dialysis at lower pHs (5.0 and 6.8), and thus closer to the isoelectric point (5.0) of EmN, led to a massive precipitation of the samples (data not shown). This further illustrated that increasing the weight of hydrophobic interactions compared to electrostatic interactions favored emerlin self-assembly and/or aggregation. Finally gel filtration experiments were performed in Tris 20 mM (pH 8.0) at two different protein concentrations (40 and 80 μM , corresponding to 1 and 3 mg/ml, respectively). Increasing EmN concentration led to the formation of high molecular oligomers in these conditions (Figure 2C).

We concluded that EmN was capable of forming different oligomers at physiological ionic strength and that addition of reducing agent and/or salt regulated EmN oligomerization / aggregation state. As the nucleus is characterized by a relatively reducing environment (33) and as the emerlin unique cysteine is not conserved between species (residue 147; Suppl. Figure 1), the biological relevance of the disulfide-mediated dimer seemed limited. We choose to control EmN oligomeric state by adding a reducing agent (10 mM β -mercaptoethanol) to the urea buffer and analyze EmN after an overnight dialysis in Tris 20 mM (pH 8.0), NaCl 30 mM. In these reducing and low salt conditions, EmN is initially mainly monomeric (Suppl. Figure 3). Moreover, it forms high molecular weight oligomers / aggregates with time, as revealed for example by following using NMR a sample of EmN at 600 μM in Tris 20 mM (pH 7.2), NaCl 30 mM, 50 mM β -mercaptoethanol: the EmN NMR signals disappeared within a few days at 10°C because of the formation of species too large to be observed by NMR.

EmN forms filaments rich in β -structure *in vitro* – We studied oligomerization of EmN over time using negative staining electron microscopy (EM). After dialysis, the protein sample was split into four aliquots which were concentrated to either 80 or 400 μM , and either kept at room temperature or heated at 65°C during 1 hour; all aliquots were finally kept at room temperature during 3 days. Observation of these aliquots using EM (Figure 3) revealed that at 20°C EmN forms either amorphous aggregates (80 μM ; Figure 3A) or spherical particles of a diameter of about 10 nm as well as irregular

filament-like structures (400 μM ; Figure 3B). After heating the sample at 65°C for 1 hour, EmN forms spherical particles as well as short filaments already at 80 μM (Figure 3C). At high concentration (400 μM) heating promotes the formation of long and curvilinear filaments with diameters of about 10 nm (Figure 3D). These data show that increase in both the temperature (20 to 65°C) and the concentration (80 and 400 μM) favors the *in vitro* formation of long and well-separated filaments. In order to test the impact of oxidation on filament assembly, either H_2O_2 or β -mercaptoethanol was added to the EmN sample just before heating during 1 hour at 65°C. EM analyses showed that only amorphous aggregates form in the presence of H_2O_2 (Figure 3E). Thus, although oxidative conditions favor dimer formation (as shown in Figure 2B), they inhibit filament assembly. Instead, reducing conditions allow filament assembly (Figure 3F).

We monitored first structural events associated to oligomerization of EmN by the fluorescent dye thioflavin T (ThT). This benzothiol dye has been used for decades in the diagnosis of protein-misfolding diseases and in kinetic studies of self-assembly. It interacts with β -sheet structures, in particular by docking onto surfaces formed by a single tyrosine ladder. This interaction is revealed by a significant increase in fluorescence intensity at 480 nm. We observed a ten-fold increase in fluorescence intensity at 480 nm when EmN at 300 μM is incubated during either 1 hour at 65°C or 3 hours at 37°C (Figure 4A). This suggested that EmN with time forms species characterized by the presence of amyloid-like β -structure. Furthermore, the emerlin samples were characterized by ATR-FTIR spectroscopy. The amide I spectral region (1600 – 1700 cm^{-1}) is informative about the stretching mode vibrations of the backbone carbonyl groups and is affected by the secondary structure of the polypeptide chain. In the spectrum of monomeric emerlin, amide I vibrations evolved at 1650 cm^{-1} (black in Figure 4B), which suggested the presence of random coil-like structure. After incubation during 1 hour at 65°C, an extra shoulder at 1615 cm^{-1} (green in Figure 4B) was observed, which revealed formation of β -sheet structure related to emerlin peptide self-assembly. Analysis using SDS-PAGE revealed that incubation during 4 hours at 65°C led to the formation of high molecular weight oligomers unable to enter the gel (Figure 4C). The presence of these oligomers yielded to a substantial decrease in total protein staining. EM images of EmN incubated during 4 hours at 65°C confirmed that these oligomers were either spherical particles or filaments with a diameter of about 10 nm (Figure 4D). Similar analyses carried out after incubation at 37°C showed that after 4 hours the EmN sample can still be observed by SDS-PAGE (Figure 4C) and that well-structured filaments can only be observed after several days (Figure 4D). Thus both formation of β -structure and assembly of filaments were facilitated when increasing the temperature from 37 to 65°C. However the EmN filaments were also observed after incubation at 37°C.

EmN variants del95-99 and Q133H occurring in EDMD are impaired in their capacity to self-assemble – We produced five EmN variants, corresponding to emerlin variants that occur in EDMD: S54F, del95-99, Q133H, P183T and P183H. These variants are similarly mainly monomeric after dialysis (Suppl. Figure 3). We further tested their capacity to self-assemble.

Following EmN self-assembly kinetics at pH 8.0 and 37°C using ThT revealed that variants S54F and P183T behave as wild-type EmN (Figure 5A). In contrast, Q133H showed a reduced ability to form β -rich structures and del95-99 did not form any type of β -rich assembly within 1 day. Further analysis of del95-99 after incubation during 4 hours at 65°C showed that even in these conditions, the variant could be observed on SDS-PAGE gel, whereas the wild-type EmN was already assembled

into high molecular weight oligomers (Figure 5B). Observation by negative staining EM of the different variants after incubation at a concentration higher than 300 μ M and a temperature of 65°C during 1 hour confirmed that, if del95-99 was unable to form filaments in these conditions (data not shown), Q133H and P183T self-assembled into filaments (Figure 6). Filaments obtained from variant P183T were indistinguishable from wild-type filaments, whereas filaments formed by Q133H at a similar time point were systematically shorter and less regular. In the case of P183H, the self-assembly kinetics was not significantly different from that measured for wild-type EmN. However, after 1 day, further self-assembly or aggregation systematically led to a decrease in detectable fluorescent signal. Such event was also observed in the case of wild-type EmN and variants S54F and P183T but only after several days. When wild-type EmN and the variants were dialyzed against a buffer at pH 6.8, closer to EmN isoelectric point (5.0), most of them could not be concentrated to 300 μ M because of aggregation. Only Q133H and del95-99 could yield this concentration. Characterization of their capacity to form β -structure after 1 day using the ThT assay showed that, at pH 6.8, Q133H had an improved capacity to self-assemble as compared to pH 8.0, whereas del95-99 still did not form filament-like structures (Suppl. Figure 4). Thus, lowering the pH from 8.0 to 6.8 favored either aggregation or self-assembly, but did not change the relative capacities of the variants to self-assemble. Altogether, these experiments suggest that P183H has the strongest capacity to self-assemble or aggregate, whereas Q133H and then del95-99 have the lowest capacities to form filament-like structures.

Proximity ligation assays suggest the presence of emerlin oligomers in cells and reveal the impact of EDMD-associated variants on emerlin-emerlin and emerlin-lamin proximities at the nuclear periphery – We carried out experiments in HeLa cells in order to detect intermolecular emerlin-emerlin and emerlin-lamin proximities. Cells were first transfected with plasmids coding for both wild-type green fluorescent protein (GFP)-full length emerlin and FLAG-full length emerlin (Figure 7A). GFP-FLAG proximities were then assessed using proximity ligation assays (PLA; Figure 7B). These experiments revealed emerlin-emerlin proximities mostly located in the nucleus, and particularly enriched at the nuclear periphery. Additional proximities were observed in the cytoplasm that could correspond to emerlin located in the endoplasmic reticulum. The effects of three emerlin variants with different filament assembly properties *in vitro*, del95-99, Q133H and P183T, were then tested on emerlin architecture in cells. Cells were transfected with a couple of plasmids coding for GFP and FLAG fusions of each variant (Figure 7A). Although HeLa cells express a pool of endogenous wild-type emerlin, the design of our PLA assay allowed quantification of emerlin-emerlin proximity events occurring only between ectopic GFP and FLAG-tagged emerlins. Quantification of PLA signals within the nuclear compartment demonstrated that variants del95-99 and Q133H created less emerlin-emerlin proximities than wild-type emerlin at the nuclear periphery of transfected cells (Figure 7C). Variant P183T uniquely accumulated into foci in the endoplasmic reticulum. Depending on the experiment and due to variability in the fraction of this variant to localize in the inner nuclear membrane, the amount of emerlin-emerlin proximities visualized by PLA was not reproducible.

Cells were also transfected with only one plasmid encoding GFP-emerlin (Figure 8A). In these cells, proximities between GFP-emerlin and endogenous lamin A/C were observed at the intranuclear periphery (Figure 8B). We further measured the proximities between the emerlin del95-99, Q133H, P183T and lamin A/C by PLA. Variants del95-99 and Q133H were significantly less frequently close to lamin A/C in HeLa cells (Figure 8C). In the case of emerlin P183T, which is not correctly targeted to the

nuclear envelope, the amount of emerin-lamin A/C proximities visualized by PLA was not reproducible. However, intense PLA signals could be observed at the nuclear envelope suggesting that variant P183T is still capable of interacting with lamin A/C.

Discussion

LEM-domain proteins LAP2, emerin and MAN1 span the inner nuclear membrane and contain large nucleoplasmic regions. These regions are predicted as mainly intrinsically disordered. Their role in nuclear envelope assembly is poorly described. Several amino acid substitutions and deletions located in emerin's "intrinsically disordered region" (IDR) are found in variants expressed in EDMD. We have obtained structural data on the *in vitro* self-assembly capacity of emerin's nucleoplasmic region. We have also identified how emerin variants with altered amino acids in the IDR self-assemble *in vitro* and are distributed in cells. From these data as well as results recently published by others (29), we propose molecular bases for a potential loss of self-assembly capacities of emerin variants and we discuss impact of self-assembly events on emerin biological function.

What evidence for emerin-emerin associations? - We observed that EmN could be expressed in bacteria and refolded to obtain a soluble protein with a yield consistent with biophysical studies. EmN0 aggregated in all tested conditions as previously reported by others (25). Wilson and co-workers proposed that residues 187-220 are essential for emerin intermolecular association both *in vitro* and in cells (29). Our results consistently demonstrated that residues 187-220 promote emerin intermolecular interactions and resulting aggregation *in vitro*. However, we also showed that at least *in vitro* and under reducing conditions, the fragment of emerin from amino acid 1 to 187 self-associates into filaments, and that in cells, two emerin variants with alterations in this fragment (del95-99 and Q133H) modify the organization of emerin at the nuclear envelope, as judged by the correct nuclear envelope targeting observed by immunofluorescence but altered frequency of emerin-emerin proximities observed by PLA.

Prediction of intermolecular binding motifs in EmN – Amino acids 1 to 187 of emerin comprise a LEM domain and a large IDR. The globular LEM domain from amino acid 1 to 45 is monomeric in solution (26, 27). The large emerin IDR from amino acid 46 to 187 could thus be responsible for EmN self-assembly. Within this IDR, the Metadisorder server predicts that two regions rich in conserved hydrophobic residues, between residues 74 and 106 (region 1) and between residues 159 and 186 (region 2), have a weaker probability to be disordered. We have shown that hydrophobic interactions were driving EmN self-assembly. Regions 1 and 2 could thus both contribute to EmN oligomerization. Since region 1 contains residues 95 to 99 whose deletion impairs filament assembly, the role of this region in EmN self-assembly is experimentally validated. We have no data to validate the structural role of region 2. Examination of the effect of mutating its conserved hydrophobic residues (Tyr161, Ile164, Tyr167) should enable to evaluate its contribution to EmN self-assembly events.

IDR are frequently the targets of post-translational modifications. Mass spectrometry analyses showed that in cells, emerin exhibits three phosphorylation hot spots corresponding to the regions from amino acid 49 to amino acid 62 (hot spot 1), from amino acid 85 to amino acid 105 (hot spot 2) and from amino acid 161 to amino acid 173 (hot spot 3) (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=2624&showAllSites=true>). Hot spots 2 and 3 are located in regions 1 and 2

identified by Metadisorder as potentially adopting preferred conformations. If regions 1 and 2 are involved in emerin self-assembly, then this structural event is probably regulated by phosphorylation in hot spots 2 and 3. In particular, hot spot 2 contains 11 phosphorylation sites described in more than 5 references, including Tyr95, Ser98 and Tyr99. We have shown that these residues are critical for filament assembly. Their phosphorylation could play a role in the regulation of wild-type emerin oligomerization. Hot spot 1 contains Ser54 that is mutated in EDMD patients. S54F does not impair EmN self-assembly *in vitro*. However, Ser54 is phosphorylated and O-GlcNAc-modified in wild-type emerin (34). The S54F amino acid substitution impairs these modifications. It also significantly disrupts further emerin O-GlcNAcylation at unknown sites. Impact of such modification defects has still to be characterized, in order to reveal if it indirectly affects emerin self-assembly properties.

A specific role for proline 183 in regulating emerin oligomerization – Proline is a residue playing an important structural role in IDRs by hindering their folding into aggregation prone structures. Mutation of this residue is frequently described as favoring the formation of amyloid-like structures. In the case of EmN, amino acid substitutions P183T and P183H do not significantly modify EmN filament assembly properties *in vitro* at pH 8.0. The molecular impact of these mutations is limited to a lower solubility of variant P183H at pH 8.0. However, we show in HeLa cells and in the context of the whole emerin protein that GFP-emerin P183T shows a significant tendency to form cytoplasmic foci close to the nuclear membrane. Ellis et al. (1999) previously demonstrated that in patient cells, emerin variants P183T and P183H were no longer confined to the nuclear fraction, but were also distributed in other membranous fractions, with the majority being associated with “heavier” membrane fractions (lysosomes, plasma membrane, mitochondria), most particularly in the case of P183H (31). Wilson and co-workers demonstrated that deletion of the region from amino acid 168 to 186 favored assembly of emerin oligomers stabilized by intermolecular interactions involving the region from amino acid 187 to 220 *in vitro* and in cells (29). They showed that it caused a relocalization of emerin into perinuclear aggregates. These data suggest that the region from amino acid 168 to 186 and in particular Pro183 limits oligomerization through the region from amino acid 187 to 220 in full-length emerin. We propose that emerin can form two types of intermolecular interactions in the reducing environment of the nucleus, one resulting from EmN self-assembly and the other resulting from dimerization of the region from amino acid 187 to 220. In this frame, Pro183 would play a critical role in regulating emerin self-assembly, not by directly influencing EmN filament formation, but by limiting the formation of oligomers stabilized by self-assembly of the region from amino acid 187 to 220 in cells. Variants P183T and P183H would consistently show a stronger tendency to form dimers through region from amino acid 187 to 220, which would lead to aggregation and mislocalization in the cytoplasm.

Relationship between emerin oligomeric state and lamin binding capacity – Binding of emerin to lamin A, which has been described using several techniques including yeast 2-hybrid assays and co-immunoprecipitation experiments, involves the fragment from amino acid 70 to 164 of emerin (35). Within this region, deletion del95-99 caused emerin to be present but significantly less associated to membranes and to the nuclear lamina components in patient cells (30), and hindered binding to lamin A *in vitro* as judged by blot overlay assays (10). From our results, we now propose a model in which loss of function of emerin variant del95-99 (weaker lamin A/C binding by PLA) relies on its defective organization at the nuclear envelope (weaker emerin-emerin associations by PLA) and is related to its self-assembly defects (absence of oligomerization *in vitro*). For variant Q133H, no qualitative or quantitative differences in nuclear targeting were observed between mutant and

normal emerin and quantitative BIAcore analysis showed no significant change in lamin A binding to emerin when the mutation was present (32). However, our results showed that the amount of emerin–lamin A/C proximities is decreased, suggesting that emerin self-assembly defects impact lamin recognition in cells. It is also possible that emerin self-assembly defects affects its interaction with other binding proteins, such as lamina-associated polypeptide 1.

Variants P83T and P183H present a mutation outside of the lamin A/C binding region of emerin. In contrast to mutations del95-99 and Q133H, we observed that mutation P183T does not prevent binding to lamin A/C (as judged by PLA). Based on an *in vitro* blot overlay assay [10], Lee et al. proposed that variant P183H has an even increased lamin binding capacity as compared to wild-type emerin. We could not see such a clear effect for variant P183T in our cell assay. We propose that the observed mistargeting of P183T emerin within cytoplasmic aggregates might be favored upon specific stimuli in the muscular tissue and consequently impact (in an indirect fashion) the formation of lamin A/C-emerin complexes at the nuclear envelope. Further work is needed to determine to what extent amino acid substitutions P183T and P183H affect lamin A/C binding in various cellular contexts and to determine whether this can be related to the proposed increased dimerization capacity through region 170-220 of that variant (see above).

Conclusion – Our study provides a first structural description of the region from amino acid 1 to amino acid 187 of emerin and reveals the structural consequences of several mutations that occur in EDMD on the self-assembly capacity of this EmN fragment *in vitro* and the amount of emerin-emerin proximities in cells. Full-length emerin can self-associate either through the EmN fragment, as shown in this study, or through the region between residues 187 and 220, as shown by others (29). We propose that mutations at positions 95-99 and 133 affect EmN self-assembly and impact lamin A/C binding in cells, whereas mutations of Pro183 affect emerin self-assembly mainly through the region between residues 187 and 220 and impact emerin localization in cells. Virtually all of the EDMD-causing mutations lead to an absence of emerin in cells, suggesting that S54F, del95-99, Q133T, P183T and P183H are loss-of-function mutations. Defects in oligomerization properties essential for emerin localization and function might explain the decreased functional capacities of the variants del95-99, Q133T, P183T and P183H. Variant S54F does not impact EmN self-assembly *in vitro*, and it is still correctly localized in cells (34). However, Ser54 is either phosphorylated or O-GlcNAc-modified in wild-type emerin and mutation of Ser54 into phenylalanine impairs posttranslational modifications at several other positions in full-length emerin (34). As the emerin regions proposed to mediate EmN self-assembly are hotspots for phosphorylation and O-GlcNAcylation in cells, we suggest that S54F might interfere with emerin-emerin interactions by perturbing the modification state of emerin *in vivo*.

Materials and Methods

Protein expression and purification - Human wild-type emerin fragments from amino acid 1 to amino acid 187 (EmN) and from amino acid 1 to amino acid 221 (EmN0) were expressed using a pETM13 vector as N-terminal octa-histidine fusions in *Escherichia coli* BL21 DE3 Star (Novagen). The emerin cDNAs were optimized for expression in *Escherichia coli* (GenScript). Mutations encoding emerin variants S54F, Q133H, Δ95-99, P183H and P183T were inserted in the EmN cDNA using a standard QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The EmGCN4 protein was also

expressed using pETM13. Its cDNA was obtained by synthesizing an optimized sequence coding for the N-terminal octa-histidine tagged EmN, a TEV cleavage site and a GCN4-derived peptide of 33 amino acids that efficiently dimerizes (36). Bacteria were cultured in ^{15}N -labelled minimum medium, induced at an optical density of 1 with 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, grown overnight at 20 °C and lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, 5% glycerol, 1% Triton X-100 and 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride. After centrifugation at 20,000g for 20 min at 4 °C, the pellet was resuspended in buffer C8 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 40 mM imidazole, 8 M urea). A second centrifugation step was performed at 20,000g for 20 min at 4 °C. The soluble extract was then filtered and loaded onto a Ni-NTA column (GE-Healthcare) equilibrated with buffer C8. Proteins were eluted directly with buffer E8 (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 M imidazole, 8 M urea). Proteins were refolded by dialysis in the desired buffer. The final yield was typically 10 mg purified protein per litre of bacterial culture. We verified that purification either from the bacterial soluble fraction or from inclusion bodies yielded a protein with the same conformation by recording NMR ^1H - ^{15}N HSQC spectra on both preparations. These two NMR spectra were superimposable (data not shown), which validates the use of a protocol including denaturation and refolding steps to obtain a pure, soluble and concentrated preparation. Oligomerization studies were performed using proteins that were reduced after affinity purification in urea by adding 10 mM β -mercaptoethanol and refolded in a buffer containing 30 mM NaCl and 10 mM dithiothreitol (DTT) to observe oligomer formation from a monomeric preparation.

NMR spectroscopy - NMR experiments were performed on a 700 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a cryogenic probe. Two-dimensional ^1H - ^{15}N correlation spectra were acquired using a HSQC pulse sequence at 20 °C, on 3 mm diameter NMR sample tube containing 100 μM uniformly ^{15}N -labelled EmN in 50mM Tris (pH 6.8), 150 mM NaCl, 10 mM DTT and 90 %:10 %, $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$.

Analytical ultracentrifugation - 360 μL protein samples at a concentration of 20 to 30 μM were dialyzed against 20 mM Tris (pH 8.0) and 0 to 150 mM NaCl. They were subjected to sedimentation velocity runs at 20 °C and 45,000 rpm (147,280 g) on a XLA70 analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) using a An-60Ti rotor. Optical density scans recorded every 5 min at 280 nm were analyzed using the Sedfit software (37) to determine the sedimentation coefficients. The EmN sample was also subjected to a sedimentation equilibrium experiment in 50 mM Tris (pH 8.0) at two successive speeds (11,500 and 13,800 rpm / 9619 and 13851 g) and 20°C. Data analysis was performed on the scans acquired on the equilibrated system using the Sedphat software (37) to determine the molecular masses of the species.

Analytical gel filtration – The proteins were first dialysed in the gel-filtration buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 30 mM NaCl) before being diluted to 1 mg/ml and loaded onto the column. Analytical gel-filtration experiments were carried out at 4°C on a Superdex 75 10/30 column (GE Healthcare).

EM – To follow large oligomer assembly, EmN, its variants or EmGCN4 in buffer E8 and 10 mM β -mercaptoethanol were dialyzed against 20 mM Tris (pH 8.0), 30 mM NaCl, 10 mM DTT. They were then incubated at 20, 37 or 65°C. Samples were taken at regular time points and observed by negative-staining transmission electron microscopy. For experiments at 20 and 65°C, His-tagged wild-type EmN was used. For experiments at 37°C, the His-Tag from the wild-type and mutated EmN constructs was cleaved using Tobacco Etch Virus (TEV) protease (see below), and proteins without Tag were incubated in 8 M urea and redialyzed against 20 mM Tris (pH 8.0), 30 mM NaCl, 10 mM

DTT. For EM experiments, about 2-5 μ l of the sample solution was deposited on a carbon-coated formvar copper grid. After 30 s, the sample droplet was blotted with filter paper. It was placed in contact with 10 μ l of water and then uranyl acetate 0.5%. Samples were imaged using a JEOL MET 1,400 (120 keV) or a Tecnai G2 (200 keV) transmission electron microscope at 10,000x to 30,000x magnification.

Thioflavin kinetics – For these experiments, the His-tag of the wild-type and mutated EmN constructs was cleaved using Tobacco Etch Virus (TEV) protease during 2 h at room temperature. EmN mixed to the His-tagged TEV was then incubated with Ni-NTA beads during 1 h in buffer C0 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 40 mM imidazole). It was collected by washing with C0, incubated in 8 M urea and redialyzed in 20 mM Tris (pH 8.0), 30 mM NaCl, 10 mM DTT. Filament assembly was followed with time by incubating EmN at the targeted concentration and temperature and by regularly taking protein aliquots to be analyzed by fluorescence. These aliquots were diluted in a thioflavin (ThT) containing buffer so as to obtain 20 μ M protein and 2,5 μ M ThT in 20 mM Tris (pH 8.0), 30 mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol. The fluorescence measurements were carried out in a 60 μ l cuvette at 20°C using a fluorimeter JASCO ADP-303T. ThT fluorescence was monitored by excitation wavelength of 450 nm. Fluorescence emission was read at 480 nm.

Attenuated total reflection – Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectrometry – ATR-FTIR spectra were recorded at 4 cm^{-1} resolution with a Bruker IFS 66 spectrophotometer equipped with a 45° N ZnSe attenuated total reflection attachment. For the FTIR experiments, EmN samples were concentrated to 800 μ M. The concentrator flow-through was used as the reference buffer sample for measuring buffer signal. FTIR spectra of the EmN sample and its corresponding buffer solution were initially recorded just after concentration. Thereafter the EmN sample was incubated during 1 hour at 65°C and additional spectra of both protein and buffer samples were recorded. Spectra of both protein and buffer samples were recorded with an average of 30 scans. The buffer spectra were subsequently subtracted from the protein spectra.

Transfection - HeLa cells were obtained from American Type Culture Collection and cultured in Minimum Essential Medium containing Glutamax (Gibco), 1% non-essential amino acids and 10% fetal bovine serum. HeLa cells were transfected using XtremeGene 9 (Roche). After 24 h, cells were processed for immunoblotting, immunofluorescence or Proximity ligation assay.

Immunoblotting - Whole cell protein extracts were suspended in Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1.5 h in TBS (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) containing 5% dry milk, incubated with mouse anti-emerin antibody (Leica; 1:300) and rabbit anti-lamin A/C (see (38); 1:5000) for 1 h in TBS with 1% milk, washed 4 times and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies. After 4 washes in TBS, proteins were detected by enhanced chemiluminescence.

Immunofluorescence microscopy - Cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 12 min at room temperature, permeabilized with phosphate-buffered saline containing 0.5 % Triton for 5 min at room temperature and quenched with 2% bovine serum albumin diluted in phosphate-buffered saline containing 0.1% Triton X-1-00. Primary antibodies were rabbit anti-lamin A/C (1:500; (39)), rabbit anti-FLAG (Sigma, 1:150) and mouse anti-GFP (Roche, 1 :150). Fluorescent labeled secondary

antibodies (donkey anti-mouse Cy2 1:60 and donkey anti-rabbit Cy3 1:200) were from Jackson ImmunoResearch. DNA was stained with Hoechst 33258 (1 µg/ml).

Proximity ligation assay (PLA) - PLA was used to detect GFP-emerin - lamin A/C interactions and GFP-emerin – FLAG-emerin interactions based on proximity (< 40 nm) of two secondary antibodies directed against these proteins. After cell fixation, cell permeabilisation and quenching (as above), pairs of primary antibodies, mouse anti-GFP 1:150 and rabbit anti-lamin A/C 1:500 or mouse anti-GFP 1:150 and rabbit anti-FLAG 1:150, were added to HeLa cells expressing GFP-emerin either alone or together with FLAG-emerin, respectively, for 30 min at room temperature. Next, Duolink PLA probe anti-rabbit plus, Duolink PLA probe anti-mouse minus and Duolink detection reagents orange (detected with a Cy3 filter) were used according to manufacturer's instructions (Olink, Bioscience). Confocal microscopy image acquisition was performed using a LSM 700 Laser scanning microscope (Zeiss). Quantitative analysis of PLA signals was done on images using Image J. Data were then analyzed by comparing median values for integrated densities of signals (Cy3) per nucleus, and statistical analysis were performed using Kruskal-Wallis tests.

Acknowledgments – The authors thank Dr E. Kasotakis and Dr M. Paternostre for constant help in carrying out ATR-FTIR and EM experiments, and Dr F.X. Theillet and Dr P. Selenko for fruitful discussions. They acknowledge the French national infrastructure FRISBI program for access to the NMR spectrometers at CEA Saclay (Gif-sur-Yvette, France), the Functional Biology and Adaptive (BFA) institute for access to the imaging facility at University Paris 7 and the Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP Berlin, Germany) for access to the fluorescence and electron microscopy facilities of the institute.

Funding - This work was supported by CNRS and University Paris 7 and by funding from the French Association against Myopathies (AFM) (research grant n°17243 to S.Z.J. and PhD fellowship n°18159 to C.S.) and from the Foundation for Medical Research (FRM) (grant FDT20140931008 to I.H.). H.J.W. was supported by a grant (AR048997) from NIH/NIAMS.

References

- 1 Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics*, **8**, 323-327.
- 2 Manilal, S., Nguyen, T.M., Sewry, C.A. and Morris, G.E. (1996) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Human molecular genetics*, **5**, 801-808.
- 3 Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T. and Arahata, K. (1996) Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics*, **12**, 254-259.
- 4 Yorifuji, H., Tadano, Y., Tsuchiya, Y., Ogawa, M., Goto, K., Umetani, A., Asaka, Y. and Arahata, K. (1997) Emerin, deficiency of which causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy, is localized at the inner nuclear membrane. *Neurogenetics*, **1**, 135-140.
- 5 Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Worman, H.J. (1999) Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *Journal of cell science*, **112** (Pt 11), 1709-1719.
- 6 Cartegni, L., di Barletta, M.R., Barresi, R., Squarzoni, S., Sabatelli, P., Maraldi, N., Mora, M., Di Blasi, C., Cornelio, F., Merlini, L. *et al.* (1997) Heart-specific localization of emerin: new insights into Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, **6**, 2257-2264.
- 7 Fairley, E.A., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J.A. (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *Journal of cell science*, **112** (Pt 15), 2571-2582.
- 8 Clements, L., Manilal, S., Love, D.R. and Morris, G.E. (2000) Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochemical and biophysical research communications*, **267**, 709-714.
- 9 Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K. and Ishiura, S. (2001) Interaction between emerin and nuclear lamins. *Journal of biochemistry*, **129**, 321-327.
- 10 Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K.L. (2001) Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *Journal of cell science*, **114**, 4567-4573.
- 11 Shin, J.Y., Mendez-Lopez, I., Wang, Y., Hays, A.P., Tanji, K., Lefkowitz, J.H., Schulze, P.C., Worman, H.J. and Dauer, W.T. (2013) Lamina-associated polypeptide-1 interacts with the muscular dystrophy protein emerin and is essential for skeletal muscle maintenance. *Developmental cell*, **26**, 591-603.
- 12 Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A. *et al.* (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics*, **21**, 285-288.
- 13 Manilal, S., Nguyen, T.M. and Morris, G.E. (1998) Colocalization of emerin and lamins in interphase nuclei and changes during mitosis. *Biochemical and biophysical research communications*, **249**, 643-647.
- 14 Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J.M., Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Wehnert, M., Morris, G.E., Whitfield, W.G.F. and Hutchison, C.J. (2001) Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *Journal of cell science*, **114**, 2577-2590.
- 15 Lattanzi, G., Cenni, V., Marmioli, S., Capanni, C., Mattioli, E., Merlini, L., Squarzoni, S. and Maraldi, N.M. (2003) Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, **303**, 764-770.
- 16 Holaska, J.M., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L. (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS biology*, **2**, E231.

- 17 Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K. and Lammerding, J. (2013) Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*, **497**, 507-511.
- 18 Chang, W., Folker, E.S., Worman, H.J. and Gundersen, G.G. (2013) Emerin organizes actin flow for nuclear movement and centrosome orientation in migrating fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, **24**, 3869-3880.
- 19 Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R. and Burridge, K. (2014) Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nature cell biology*, **16**, 376-381.
- 20 Lammerding, J., Hsiao, J., Schulze, P.C., Kozlov, S., Stewart, C.L. and Lee, R.T. (2005) Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *The Journal of cell biology*, **170**, 781-791.
- 21 Segura-Totten, M., Kowalski, A.K., Craigie, R. and Wilson, K.L. (2002) Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *The Journal of cell biology*, **158**, 475-485.
- 22 Hirano, Y., Segawa, M., Ouchi, F.S., Yamakawa, Y., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T. (2005) Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a xenopus egg cell-free system. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 39925-39933.
- 23 Bengtsson, L. and Wilson, K.L. (2006) Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Molecular biology of the cell*, **17**, 1154-1163.
- 24 Yates, J.R. and Wehnert, M. (1999) The Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Mutation Database. *Neuromuscular disorders : NMD*, **9**, 199.
- 25 Roberts, R.C., Sutherland-Smith, A.J., Wheeler, M.A., Jensen, O.N., Emerson, L.J., Spiliotis, I., Tate, C.G., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J.A. (2006) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy associated-protein emerin is phosphorylated on serine 49 by protein kinase A. *The FEBS journal*, **273**, 4562-4575.
- 26 Wolff, N., Gilquin, B., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S. (2001) Structural analysis of emerin, an inner nuclear membrane protein mutated in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *FEBS letters*, **501**, 171-176.
- 27 Cai, M., Huang, Y., Suh, J.Y., Louis, J.M., Ghirlando, R., Craigie, R. and Clore, G.M. (2007) Solution NMR structure of the barrier-to-autointegration factor-Emerin complex. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 14525-14535.
- 28 Tifft, K.E., Bradbury, K.A. and Wilson, K.L. (2009) Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerin by Src, Abl and other kinases. *Journal of cell science*, **122**, 3780-3790.
- 29 Berk, J.M., Simon, D.N., Jenkins-Houk, C.R., Westerbeck, J.W., Gronning-Wang, L.M., Carlson, C.R. and Wilson, K.L. (2014) The molecular basis of emerin-emerin and emerin-BAF interactions. *Journal of cell science*, **127**, 3956-3969.
- 30 Ellis, J.A., Craxton, M., Yates, J.R. and Kendrick-Jones, J. (1998) Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *Journal of cell science*, **111 (Pt 6)**, 781-792.
- 31 Ellis, J.A., Yates, J.R., Kendrick-Jones, J. and Brown, C.A. (1999) Changes at P183 of emerin weaken its protein-protein interactions resulting in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Human genetics*, **104**, 262-268.
- 32 Holt, I., Clements, L., Manilal, S. and Morris, G.E. (2001) How does a g993t mutation in the emerin gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy? *Biochemical and biophysical research communications*, **287**, 1129-1133.
- 33 Go, Y.M. and Jones, D.P. (2010) Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. *Antioxidants & redox signaling*, **13**, 489-509.
- 34 Berk, J.M., Maitra, S., Dawdy, A.W., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Wilson, K.L. (2013) O-Linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates emerin binding to barrier to autointegration factor (BAF) in a chromatin- and lamin B-enriched "niche". *The Journal of biological chemistry*, **288**, 30192-30209.

- 35 Berk, J.M., Tifft, K.E. and Wilson, K.L. (2013) The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucleus*, **4**, 298-314.
- 36 Ciani, B., Bjelic, S., Honnappa, S., Jawhari, H., Jaussi, R., Payapilly, A., Jowitt, T., Steinmetz, M.O. and Kammerer, R.A. (2010) Molecular basis of coiled-coil oligomerization-state specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 19850-19855.
- 37 Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal*, **78**, 1606-1619.
- 38 Duband-Goulet, I., Woerner, S., Gasparini, S., Attanda, W., Konde, E., Tellier-Lebegue, C., Craescu, C.T., Gombault, A., Roussel, P., Vadrot, N. *et al.* (2011) Subcellular localization of SREBP1 depends on its interaction with the C-terminal region of wild-type and disease related A-type lamins. *Experimental cell research*, **317**, 2800-2813.
- 39 Vadrot, N., Duband-Goulet, I., Cabet, E., Attanda, W., Barateau, A., Vicart, P., Gerbal, F., Briand, N., Vigouroux, C., Oldenburg, A.R. *et al.* (2015) The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Human molecular genetics*, **24**, 2096-2109.
- 40 Kozlowski, L.P. and Bujnicki, J.M. (2012) MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC bioinformatics*, **13**, 111.

Figure legends:

Figure 1. Emerin region from residue 1 to residue 187 (EmN) is predicted and observed to be mainly unstructured in solution. (A) Schematic representation of emerin. The two structured domains are represented in orange for the LEM domain (LEM 1-45) and in green for the transmembrane domain (TM 223-243). **(B)** Emerin fragments expressed for this study. **(C)** Metadisorder profile of emerin (40): apart from the two structured domains (LEM and TM) that have a disorder probability lower than 0.5, most of the other residues are predicted as disordered. Nevertheless, three regions, between residues 74 to 106, residues 159 to 186 and residues 203 to 208, show intermediate scores between 0.5 and 0.7. The red dots mark positions mutated in EDMD causing missense or micro-deletion variants. **(D)** 2D NMR ^1H - ^{15}N spectra recorded on a EmN sample at 100 μM in 50mM Tris-HCl pH6.7, 150mM NaCl, 10 mM DTT at 20°C and 700 MHz. Superposition of the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum in black (each peak corresponds to one residue; peaks corresponding to poorly structured residues have a ^1H chemical shift comprised between 7.8 and 8.4 ppm) and the saturated $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ nOe spectrum in orange (positive peaks corresponding to structured residues) and blue (negative peaks corresponding to fully disordered residues). Residues with intermediate dynamical behavior have nOe values close to zero and thus are not visible on the saturated ^1H to ^{15}N nOe spectrum.

Figure 2. EmN can form dimers and higher molecular weight oligomers / aggregates in solution. (A) AUC sedimentation velocity results obtained on samples of EmN at 20 μM in 20mM Tris-HCl pH8, in three different salt conditions (0mM, 30mM and 150mM NaCl). Three species are present in these conditions, which might correspond to an elongated monomer (sedimentation coefficient of 2.1S and frictional ratio of 1.52), an elongated dimer (sedimentation coefficient of 3.2S and frictional ratio of 1.58) and high molecular weight oligomers and/or aggregates. **(B)** Non-reducing SDS-PAGE of EmN in 20 mM Tris (pH 8.0), 30 mM NaCl and different concentrations of β -mercaptoethanol showing a disappearance of EmN dimers in presence of reducing agent. **(C)** Gel filtration profile obtained after dialysis of EmN: samples 1 (black full lines) and 2 (black dashed lines) were injected on the column at 1 and 3 mg/ml respectively. Clearly sample 2 contains oligomers and/or aggregates that could not pass the column prefilter. Both samples also contain monomers (elution volume corresponding to 33 kDa, the protein being a 25 kDa elongated protein), dimers (elution volume corresponding to 66 kDa) and oligomers (elution at the void volume).

Figure 3. EmN can form filaments in a concentration / temperature / reducing conditions dependent manner. (A-D) EM images acquired on a EmN sample concentrated at either 80 or 400 μM in a low salt concentration buffer (20mM Tris-HCl [pH8.0], 30mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol) and not heated or heated during 1 hour at 65°C. **(E-F)** EM images acquired on a EmN sample concentrated at 400 μM with either **(E)** 10 mM H_2O_2 or **(F)** 10 mM β -mercaptoethanol and heated 1 hour at 65°C in a low salt concentration buffer (20 mM Tris-HCl [pH8.0], 30 mM NaCl). All samples were observed by negative staining EM using uranyl acetate after 3 days at 20°C. The black bars correspond to 200 nm.

Figure 4. EmN filament assembly at either 37 or 65°C is associated with an increase of β -structure. EmN self-assembly kinetics followed by **(A)** ThT fluorescence on a EmN sample at 300 μM in 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 30 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol, heated at either 37°C (orange) or 65°C

(green) during 4 hours, **(B)** ATR-FTIR on a EmN sample at 1.2 mM before (black) and after (green) heating during 1 hour at 65°C, **(C)** SDS-PAGE on a EmN sample at 300 μ M (molecular weight markers correspond to 20, 30, 45 and 60 kDa, as in Figure 5; S and P correspond to Supernatant and Pellet, respectively) and **(D)** EM on a EmN sample at 700 μ M (the black bar corresponds to 200 nm; negative staining was achieved using uranyl acetate).

Figure 5. EmN EDMD-causing variants del95-99 and Q133H have impaired oligomerization capacities. **(A)** Fluorescence signals measured at 480 nm after addition of ThT. The wild-type and mutated EmN samples were concentrated up to 300 μ M in 20mM Tris-HCl pH8, 30mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol and heated during 1 day at 37°C. **(B)** SDS-PAGE of wild-type and del95-99 EmN after heating the samples at 65°C during either 1 or 4 hours (S and P correspond to Supernatant and Pellet, respectively).

Figure 6. EmN variant Q133H still form filaments that resemble wild-type and variant P183T filaments after heating 1 hour at 65°C. EM images were acquired on samples concentrated above 300 μ M and heated during 1 hour at 65°C. The black bars correspond to 100 nm. Negative staining was achieved using uranyl acetate.

Figure 7. Impact of emerlin variants expressed in EDMD on nuclear emerlin-emerlin proximities as detected by PLA. **(A)** Whole cell protein extracts prepared from HeLa cells co-expressing either wild-type, del95-99, Q133H or P183T GFP and FLAG-emerlins were analyzed by western blot using anti-emerlin antibodies. The expression of endogenous A-type lamins revealed by anti-LA/C antibodies is also shown. **(B)** HeLa cells co-expressing either wild-type (WT), del95-99, Q133H or P183T GFP and FLAG-tagged emerlins were fixed, labeled with anti-GFP and anti-FLAG antibodies, and processed for PLA before analysis at the confocal microscope. The PLA signals are shown alone (upper row) and merged with DNA staining and GFP fluorescence (lower row). **(C)** Quantification of PLA signals per nucleus for cells as shown in B). Are shown the median values for the total signal intensity per nucleus for 3 independent experiments (EXP1, EXP2, EXP 3; n = 150-330 nuclei per sample). Boxes show first and third quartiles (**p < 0.001, *p<0.05 with Kruskal and Wallis test).

Figure 8. Impact of emerlin variants expressed in EDMD on nuclear emerlin-lamin A/C proximities as detected by PLA. **(A)** Whole cell protein extracts prepared from HeLa cells expressing either WT, del95-99, Q133H or P183T GFP-emerlin were analyzed by western blot using anti emerlin antibodies. Shown is also the expression of endogenous A-type lamins revealed by anti-LA/C antibodies. **(B)** HeLa cells overexpressing either WT or mutant del95-99, Q133H and P183T GFP-emerlin were fixed, labeled with anti-GFP antibodies, and processed for PLA before analysis at the confocal microscope. The PLA signals are shown alone (upper row) and merged with DNA staining and GFP fluorescence (lower row). **(C)** Quantification of PLA signals per nucleus for cells as shown in (B). Are shown the median values for the total signal intensity per nucleus for 3 independent experiments (EXP1, EXP2, EXP 3; n = 180-340 nuclei per sample). Boxes show first and third quartiles (**p < 0.001, *p<0.05 with Kruskal and Wallis test).

Supplementary materials.

Supplementary Figure 1. Alignment of emerlin sequences from 17 different mammalian species. Each sequence is identified by its Genbank Identifier code. The numbering in black above the sequences corresponds to human emerlin. Positions mutated in EDMD causing missense or micro-deletion variants are squared in blue.

Supplementary Figure 2. AUC sedimentation equilibrium analysis of EmN. This AUC plot was obtained on an EmN sample at 17.4 μ M centrifuged at either 9619 g (black) or 13851 g (orange).

Supplementary Figure 3. Purification of an EmN sample in low salt and reducing conditions. Gel filtration of the EmN sample carried out immediately after dialysis shows that in these conditions EmN is mainly monomeric. (A) Schematic representation of EmN (Emerin 1-187) in blue and the dimeric construct EmGCN4 in red. This last construct possesses a C-terminal tag of 43 residues resulting from protein engineering and designed as to dimerize. (B) Gel filtration on EmN (blue), EmGCN4 (in red), and EmN EDMD-causing mutants (black lines) in a low salt concentration buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM NaCl). The EmGCN4 construct is used as a control corresponding to the dimeric form of EmN. (C) AUC Sedimentation velocity results obtained on EmN (blue) and EmGCN4 (red) in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM NaCl.

Supplementary Figure 4. Fluorescence emission spectra recorded after addition of ThT on samples of variants del95-99 (t=0 orange; t=24h brown) and Q133H (t=0 light green; t=24h dark green) incubated in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8), 30 mM NaCl at 37°C. The corresponding reducing SDS-PAGE gel is shown at the upper right of the figure. The supernatant (S) and pellet (P) fractions of the samples were deposited before and after incubation at 37°C during 24 hours. Formation of high molecular weight oligomers yields to a decrease in total protein staining.

Abbreviations:

AUC: Analytical Ultracentrifugation; EDMD: Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy; EM: electron microscopy; ITC: Isothermal Titration Calorimetry; LA/C: lamin A/C; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; PLA: Proximity Ligation Assay; ThT: Thioflavin-T.

Figure 1

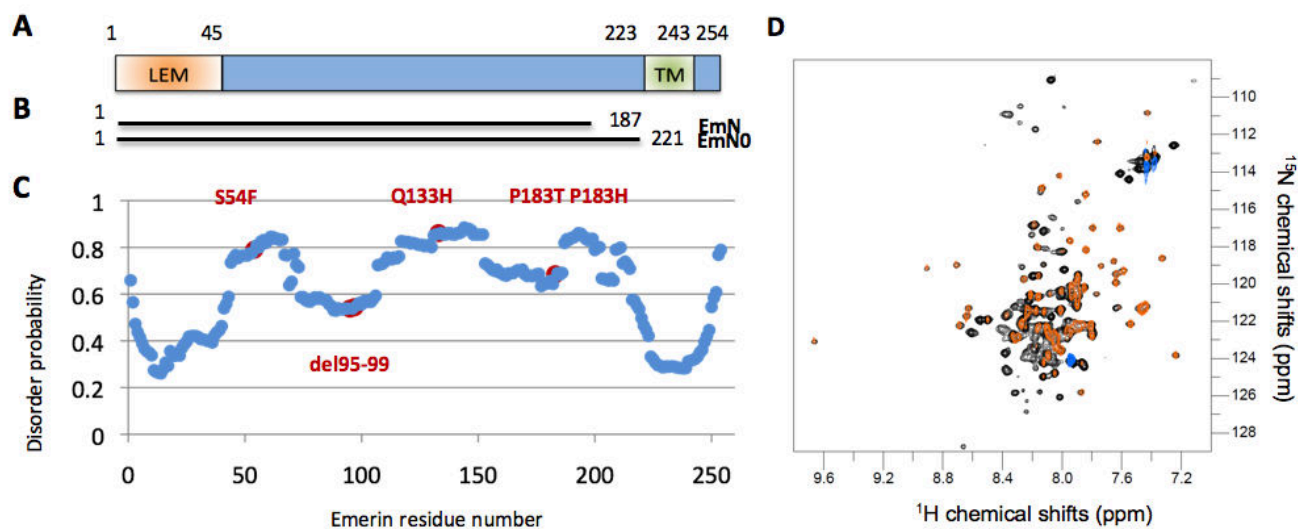


Figure 2

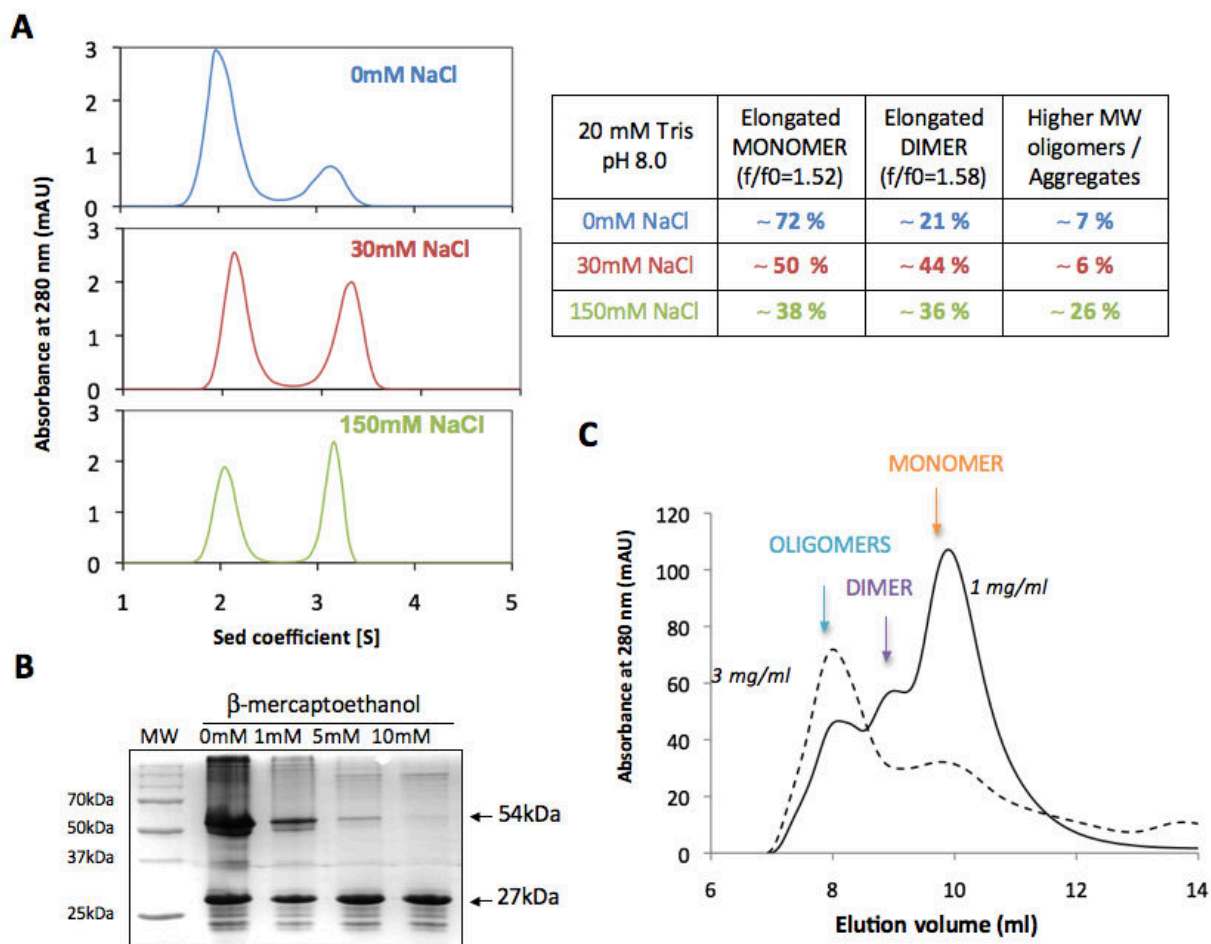


Figure 3

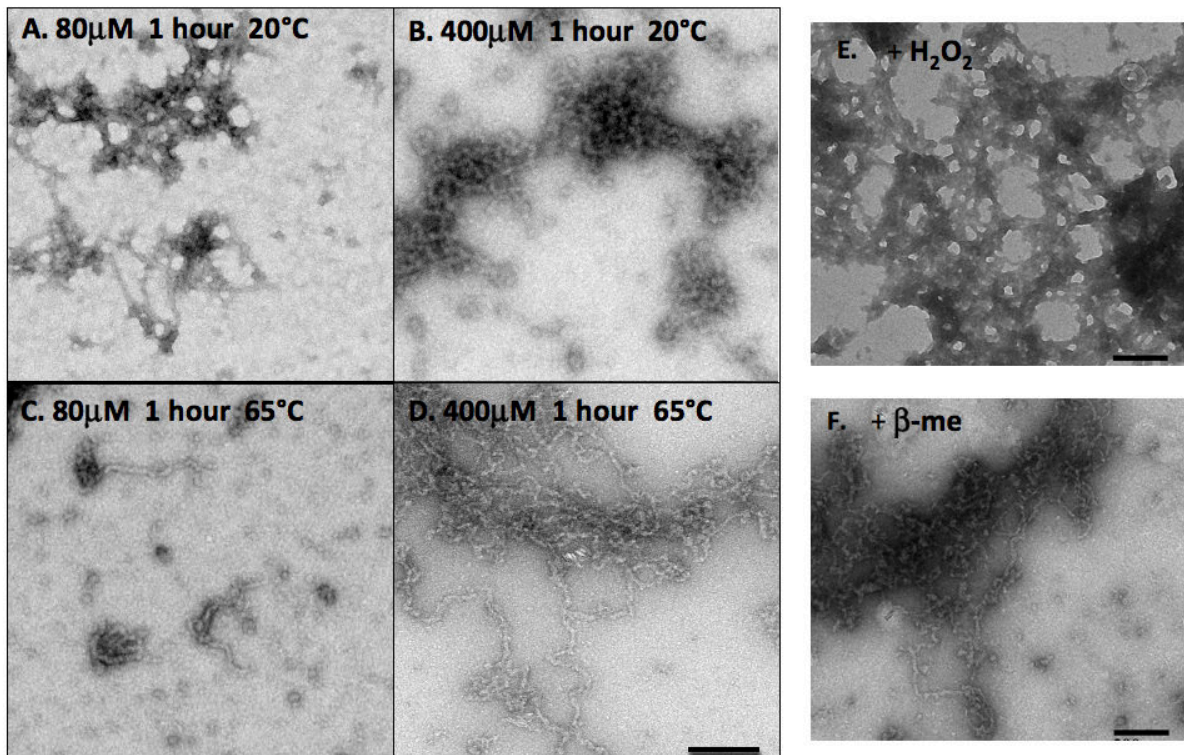


Figure 4

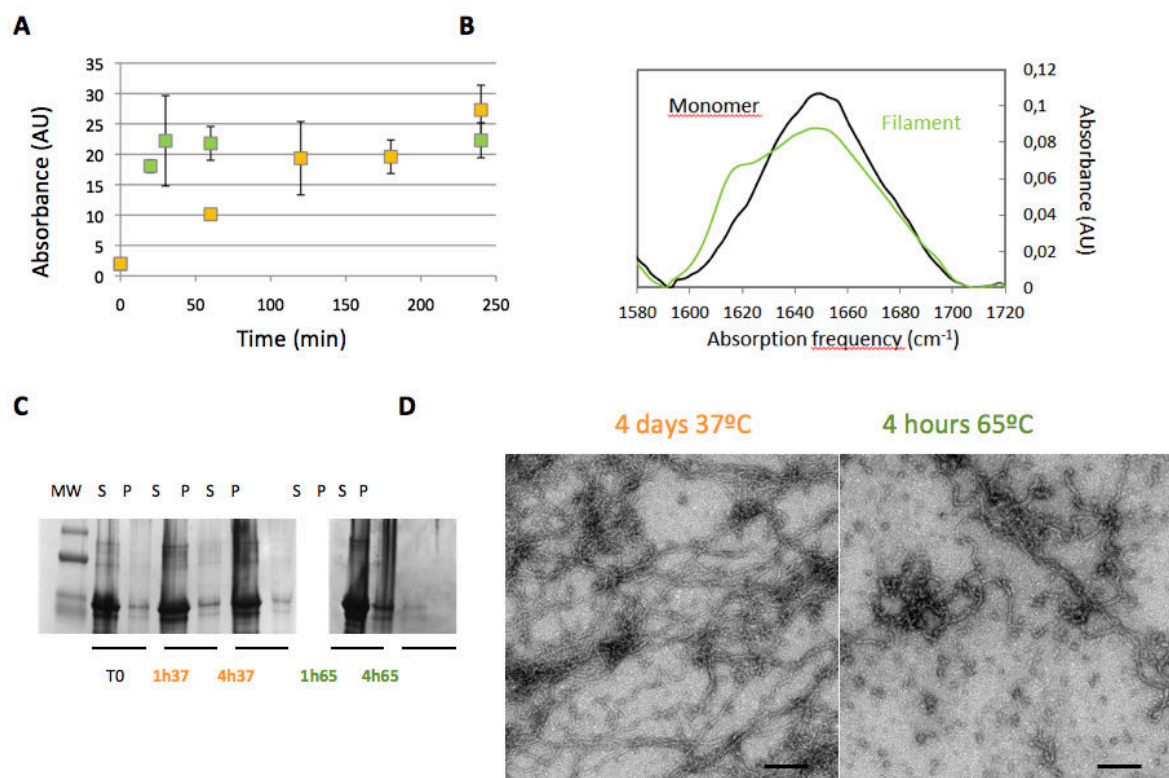


Figure 5

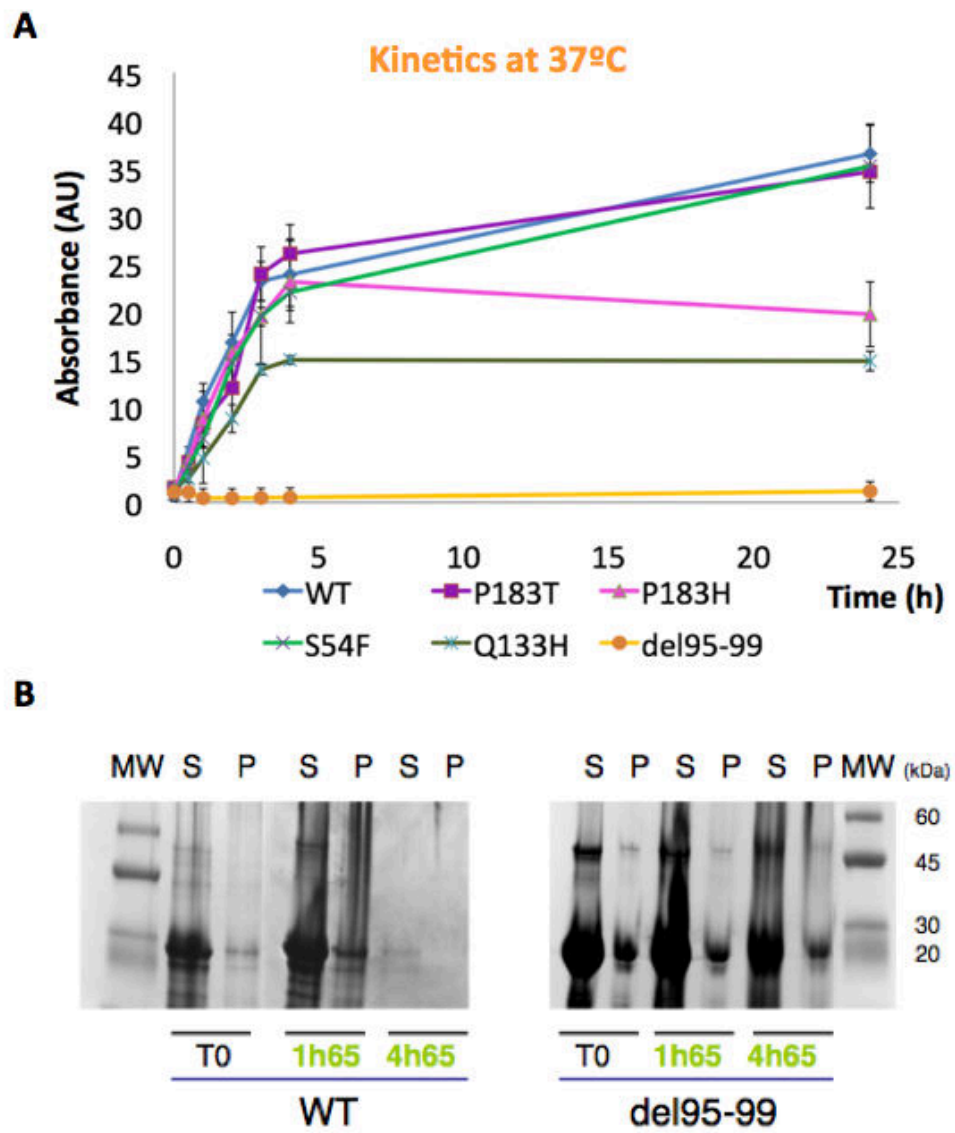


Figure 6

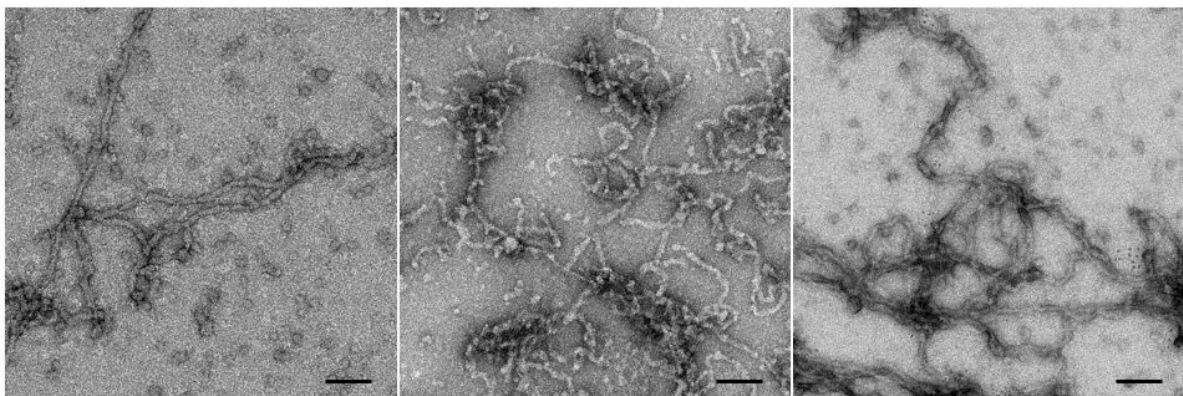


Figure 7

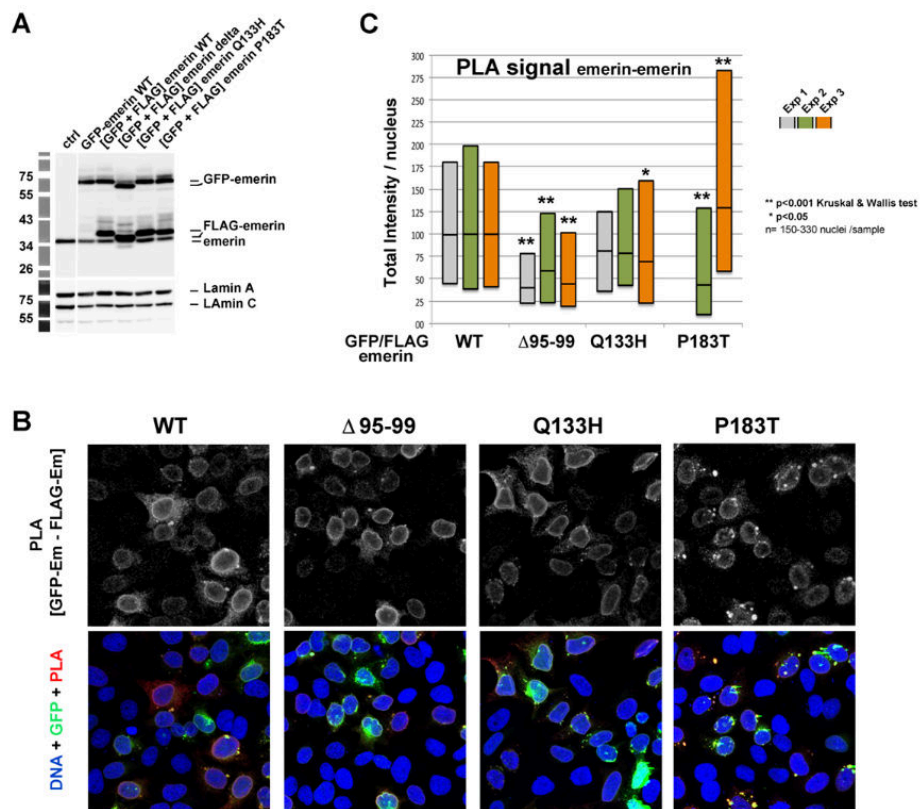
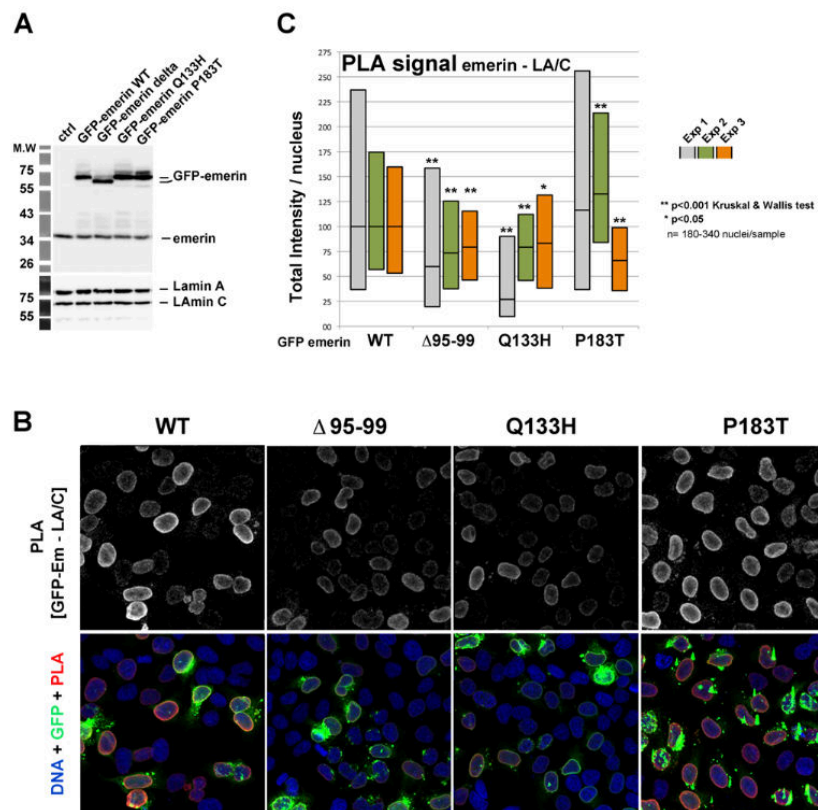


Figure 8



Supplementary materials.

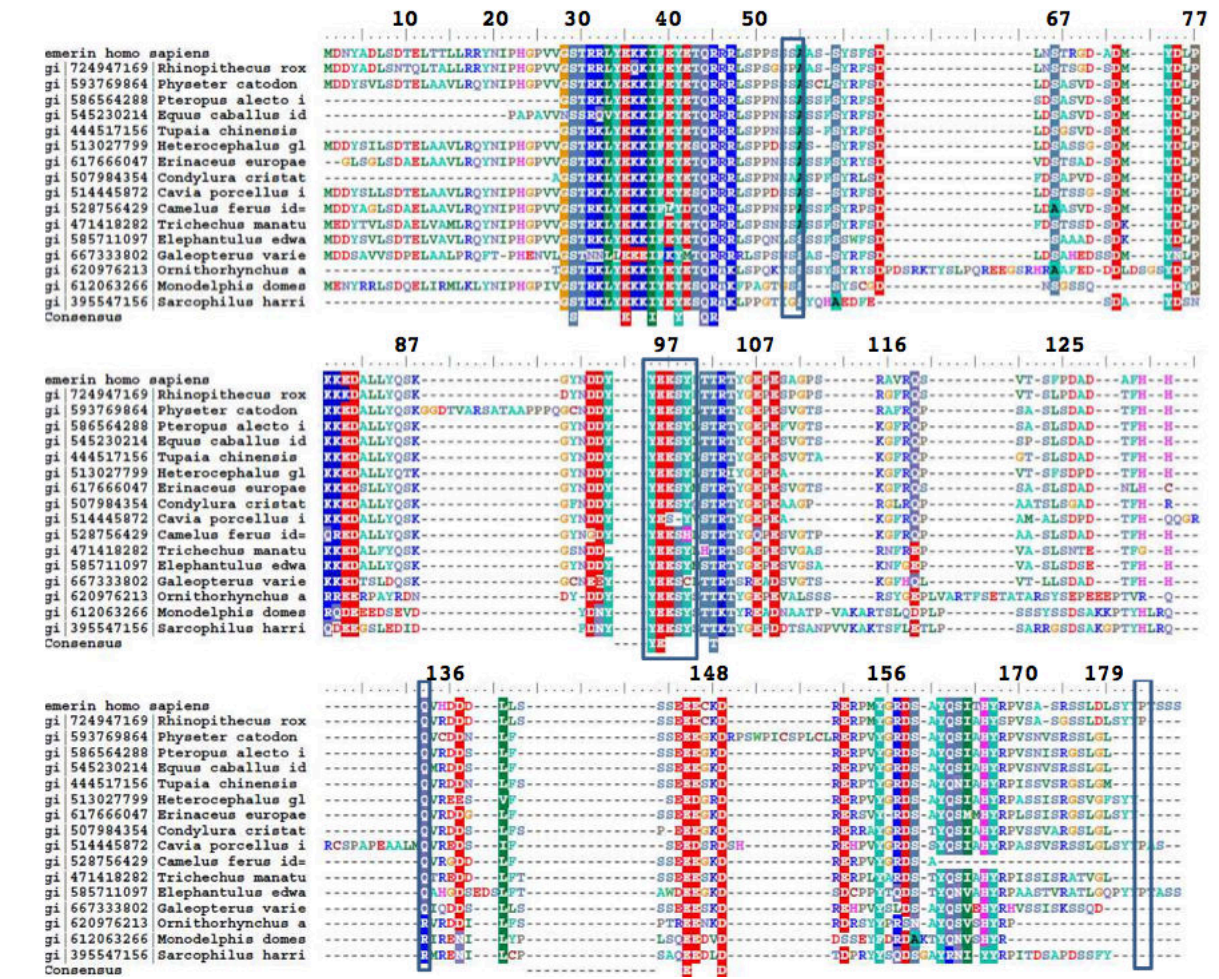
Supplementary Figure 1. Alignment of emerlin sequences from 17 different mammalian species. Each sequence is identified by its Genbank Identifier code. The numbering in black above the sequences corresponds to human emerlin. Positions mutated in EDMD causing missense or micro-deletion variants are squared in blue.

Supplementary Figure 2. AUC sedimentation equilibrium analysis of EmN. This AUC plot was obtained on an EmN sample at 17.4 μ M centrifuged at either 9619 g (black) or 13851 g (orange).

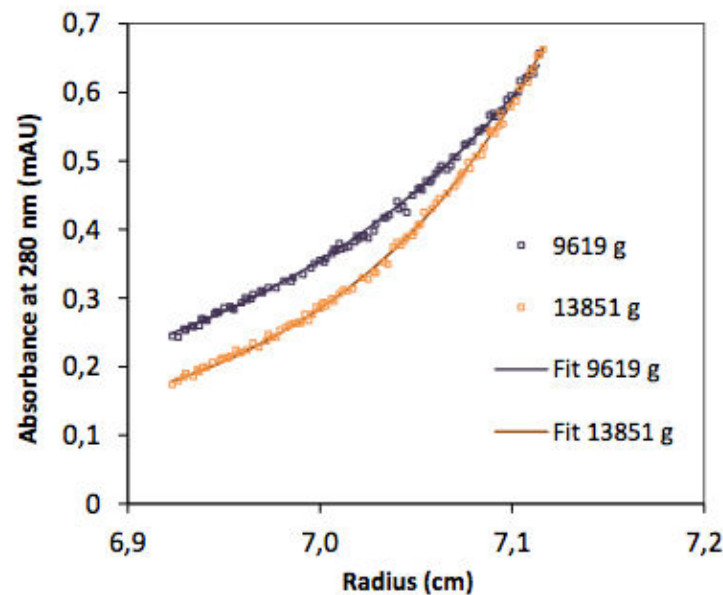
Supplementary Figure 3. Purification of an EmN sample in low salt and reducing conditions. Gel filtration of the EmN sample carried out immediately after dialysis shows that in these conditions EmN is mainly monomeric. (A) Schematic representation of EmN (Emerin 1-187) in blue and the dimeric construct EmGCN4 in red. This last construct possesses a C-terminal tag of 43 residues resulting from protein engineering and designed as to dimerize. (B) Gel filtration on EmN (blue), EmGCN4 (in red), and EmN EDMD-causing mutants (black lines) in a low salt concentration buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM NaCl). The EmGCN4 construct is used as a control corresponding to the dimeric form of EmN. (C) AUC Sedimentation velocity results obtained on EmN (blue) and EmGCN4 (red) in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM NaCl.

Supplementary Figure 4. Fluorescence emission spectra recorded after addition of ThT on samples of variants del95-99 (t=0 orange; t=24h brown) and Q133H (t=0 light green; t=24h dark green) incubated in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8), 30 mM NaCl at 37°C. The corresponding reducing SDS-PAGE gel is shown at the upper right of the figure. The supernatant (S) and pellet (P) fractions of the samples were deposited before and after incubation at 37°C during 24 hours. Formation of high molecular weight oligomers yields to a decrease in total protein staining.

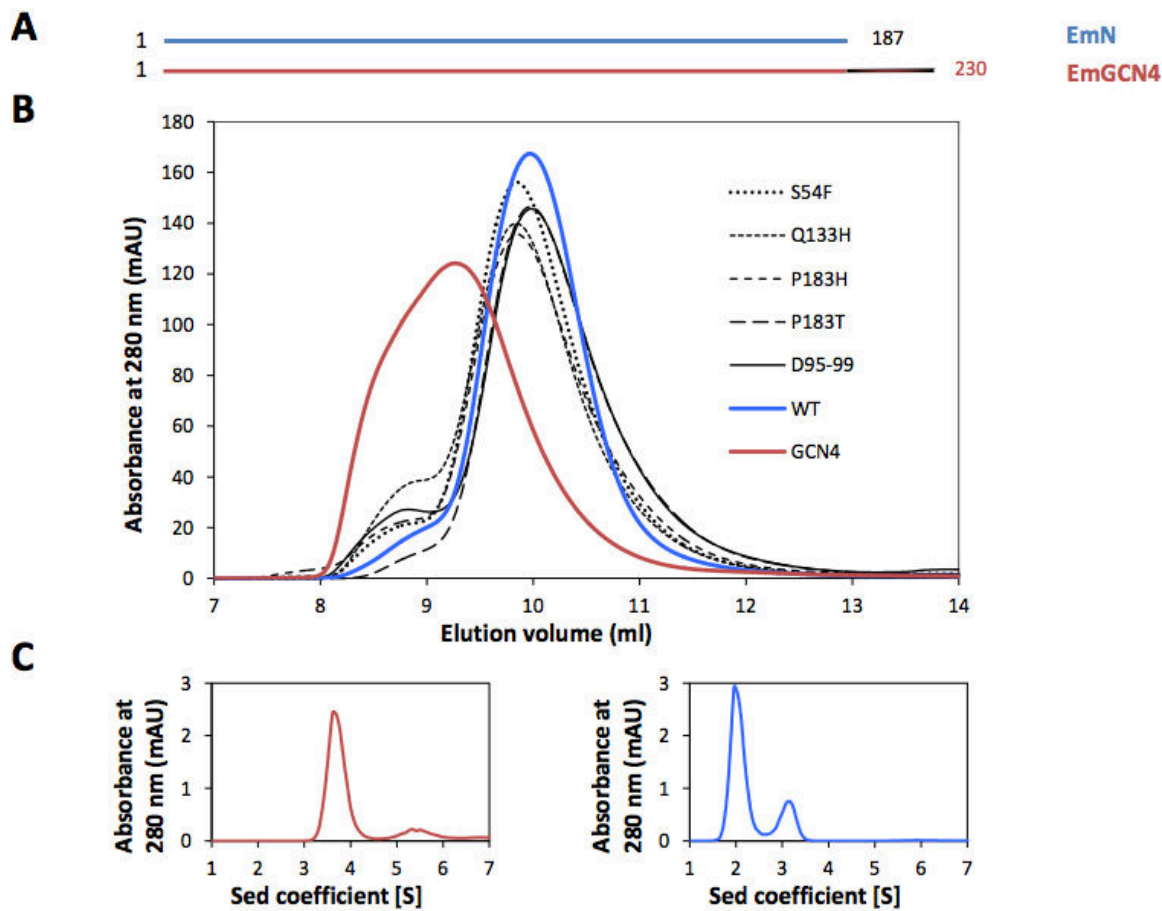
Suppl. Figure 1



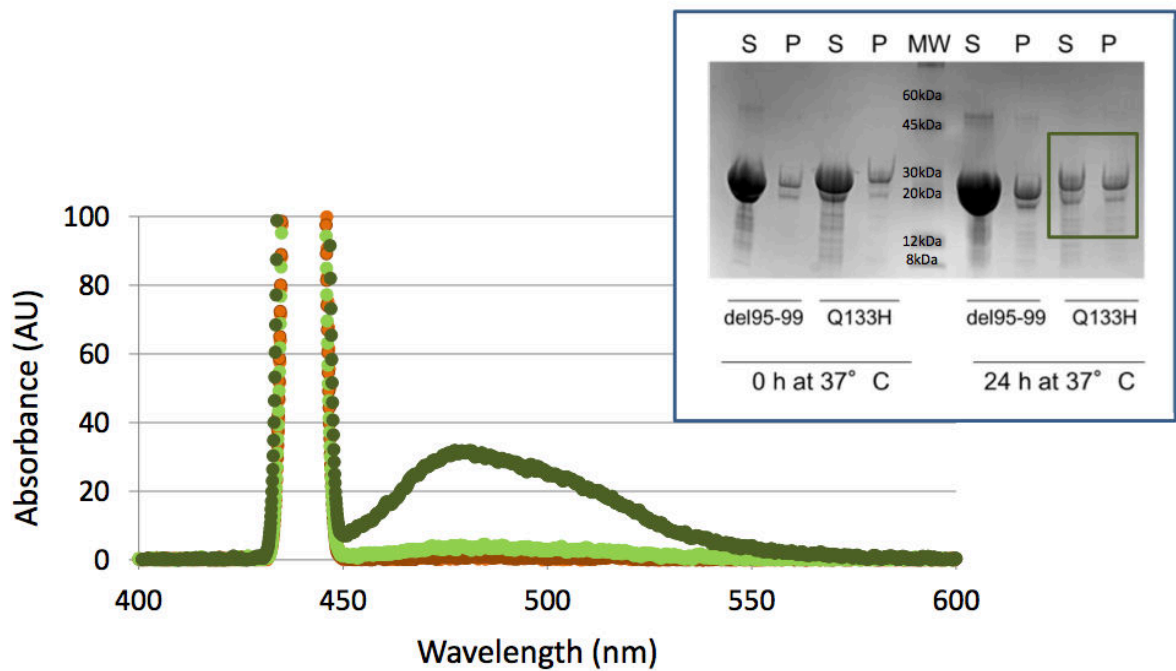
Suppl. Figure 2



Suppl. Figure 3



Suppl. Figure 4



Résumé

Plusieurs publications, parues lors de ma thèse, ont révélé que les protéines de la membrane nucléaire interne (INM) et plus particulièrement l'émerine, la lamine A, SUN1, l'actine et BAF, jouaient un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques du noyau et de la cellule. L'assemblage de l'enveloppe nucléaire et les interactions de ces protéines entre-elles sont régulées par des événements de phosphorylation et d'oligomérisation. Mon objectif était de décrire les événements moléculaires essentiels à l'assemblage de l'enveloppe nucléaire interne, afin de pouvoir par la suite comprendre comment l'enveloppe nucléaire répond à un stress mécanique.

J'ai dans un premier temps caractérisé les événements d'oligomérisation et de phosphorylation de la protéine émerine. J'ai montré que cette protéine était capable de former, *in vitro* et en cellules, de gros oligomères indispensables à son interaction avec la lamine A. J'ai également observé que des mutations dans l'émerine, aboutissant à la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, affectaient les propriétés d'auto-association de cette protéine.

En parallèle, j'ai étudié les interactions entre émerine, lamine, SUN1, actine et BAF *in vitro*. J'ai pu montrer des interactions directes entre le domaine C-terminal de la lamine A et les protéines émerine, actine et SUN1. Ces trois protéines lient la lamine A sur des surfaces différentes suggérant l'existence de complexes à 3 ou 4 protéines dans la cellule. L'analyse des modes de régulation des interactions entre ces protéines doit être poursuivie afin de comprendre quels sont les événements moléculaires essentiels au maintien de l'intégrité nucléaire et à la transmission d'un signal mécanique entre le cytosquelette et le nucléosquelette.

Abstract

During my PhD, several papers revealed that the inner nuclear membrane (INM) proteins, and especially emerin, lamin A, SUN1, actin and BAF, played an essential role in the mechanical properties of the nucleus and the cell. The nuclear envelope assembly and the interactions between these proteins are regulated by phosphorylation and oligomerization events. My aim was to describe molecular events essential for inner nuclear envelope assembly as a first step to understand how the nuclear envelope responds to a mechanical stress.

I first characterized the oligomerization and phosphorylation states of the protein emerin. I showed that this protein is capable of forming, *in vitro* and in cells, large oligomers essential to its interaction with lamin A. I also observed that several emerin mutations leading to Emery-Dreifuss muscular dystrophy impaired the self-association properties of this protein.

In parallel, I studied the interactions between emerin, lamin, SUN1, actin and BAF *in vitro*. I was able to demonstrate direct interactions between the C-terminal domain of lamin A and the proteins emerin, actin and SUN1. These three proteins bind lamin A on different surfaces suggesting the existence of complexes of 3 or 4 proteins in the cell. Analysis of the mechanisms regulating interactions between these proteins should be pursued in order to understand what are the molecular events responsible for the maintenance of nuclear integrity and the transmission of a mechanical signal between the cytoskeleton and the nucleoskeleton.